

**PROGRAMME EUROPEEN  
DOCUP 2000-2006**

**PROGRAMME DE TRAVAUX D'APPUI AU DEVELOPPEMENT  
DE LA CANNE A SUCRE EN GUADELOUPE**

**CONTRAT D'ENTREPRISE DU CIRAD-CA – 1<sup>ère</sup> TRANCHE**

**RAPPORT D'ACTIVITES – SECONDE PARTIE**

**MALADIE DE LA CANNE A SUCRE**

**Chercheur : Jean-Heinrick DAUGROIS**

**Techniciens : Rosiane BOISNE-NOC  
Steeve JOSEPH**

**VCAT : Sandrine BONOTTO  
Myriam SIEGWART**

**Participation : Jean-Claude EFILE  
Technique Jean-Marie COUPAN  
Sylvère CARMEL**



**PROGRAMME EUROPEEN  
DOCUP 2000-2006**

**PROGRAMME DE TRAVAUX D'APPUI AU DEVELOPPEMENT  
DE LA CANNE A SUCRE EN GUADELOUPE**

**CONTRAT D'ENTREPRISE DU CIRAD-CA – 1<sup>ère</sup> TRANCHE**

*RAPPORT D'ACTIVITES – SECONDE PARTIE*

**MALADIES DE LA CANNE à SUCRE**

Table de matière (43 pages):	page
RAPPORT D'ACTIVITES, SYNTHESE	2 - 7
<b>RAPPORT ANALYTIQUE :</b>	
<b>Opération n°1. Contrôle des maladies de la canne à sucre.</b>	<b>8</b>
<i>Action n°1</i> : Suivi de l'évolution phytosanitaire de la canne à sucre en Guadeloupe et dans les Caraïbes.	8
<i>Action n°2</i> : Analyse de l'impact des maladies sur le rendement des variétés cultivées, Etude de l'impact du rabougrissement des repousses sur les rendements.	10
<i>Action n°3</i> : Epidémiologie du SCYLV	14
<b>Opération n°2. Appui de la pathologie à l'amélioration variétale.</b>	<b>22</b>
<i>Action n°1</i> : Criblage des variétés en cours de sélection pour la résistance aux principales maladies.	22
<i>Action n°2</i> : Recherche de nouvelles méthodes de criblage pour la résistance aux maladies	29
<b>Opération n°3. Epidémiologie de l'échaudure des feuilles.</b>	<b>33</b>
<i>Action n°1</i> : Dissémination aérienne de <i>Xanthomonas albilineans</i> .	33
<i>Action n°2</i> : Capacité colonisatrice et diversité génétique de <i>Xanthomonas albilineans</i> .	36

**PROGRAMME EUROPEEN  
DOCUP 2000-2006**

**PROGRAMME DE TRAVAUX D'APPUI AU DEVELOPPEMENT  
DE LA CANNE A SUCRE EN GUADELOUPE**

**CONTRAT D'ENTREPRISE DU CIRAD-CA – 1<sup>ère</sup> TRANCHE**

*RAPPORT D'ACTIVITES – SECONDE PARTIE*

**MALADIES DE LA CANNE à SUCRE**

**Chef de service :** Jean Heinrich DAUGROIS.

**VCAT :** Sandrine Bonotto (jusqu'au 30/08/2002)  
Myriam Siegwart (à partir du 01/10/2002)

**Techniciens :** Rosiane BOISNE-NOC  
Steeve JOSEPH

**Partenaires :** Chercheurs nationaux : CIRAD – INRA et SPV Guadeloupe  
Autres alliances : J. Hoy, USA (Louisiane), O. Despradel, Central Romana (Rep Dominicaine), WISBEN (West Indies Sugarcane Breeding Network).

**RAPPORT D'ACTIVITES, SYNTHESE :**

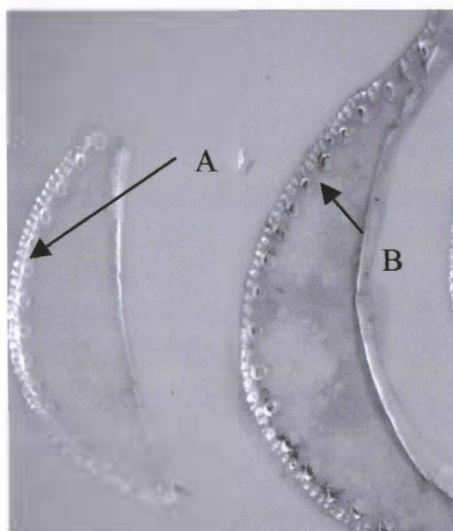
**1. Contrôle des maladies de la canne à sucre. (opération 1).**

**Objectifs :** Suivre et prévoir l'évolution phytosanitaire des plantations de canne à sucre. Evaluer l'impact des maladies majeures et des nouvelles maladies sur la production de canne à sucre.

**1.1. Suivi de l'évolution phytosanitaire de la canne à sucre en Guadeloupe et dans les Caraïbes.**

En cette année humide, de nombreux cas d'échaudure des feuilles (variété B69 566) et de Pokkah Boeng (variété B80 689 et R570) ont été observés ainsi que quelques cas de dégât sévères causés par des foreurs de tige.

Comme prévu, le schéma de pépinière a été contrôlé, conjointement avec le SPV, pour la présence de maladies systémiques. Les diagnostics de 3 maladies [échaudure des feuilles, rabougrissement des repousses et feuille jaune (anciennement appelée syndrome de la feuille jaune)] ont été effectués par la méthode des immunoempreintes. Si le schéma de pépinière permet un très bon contrôle de la maladie du rabougrissement des repousses, il n'en est pas de même pour les deux autres maladies testées. La présence de *Xanthomonas albilineans* et du *Sugarcane Yellow Leaf Virus* (SCYLV) a été mise en évidence dès la deuxième étape de pépinière (pré-pépinières). Les pourcentages de diagnostics positifs pour ces deux maladies sont respectivement de 3,3% et 3,9% pour les 540 échantillons testés. *X. albilineans* est présent essentiellement en Basse Terre sur la variété sensible B69 566 tandis



Immuno-empreintes de nervure centrale de feuille de canne à sucre pour le diagnostic du SCYLV. A : feuille saine, les faisceaux vasculaires sont clairs. B : feuille contaminée, les faisceaux vasculaires présentent une coloration foncée, due au complexe antigènes anticorps formé entre le virus et les anticorps utilisés.

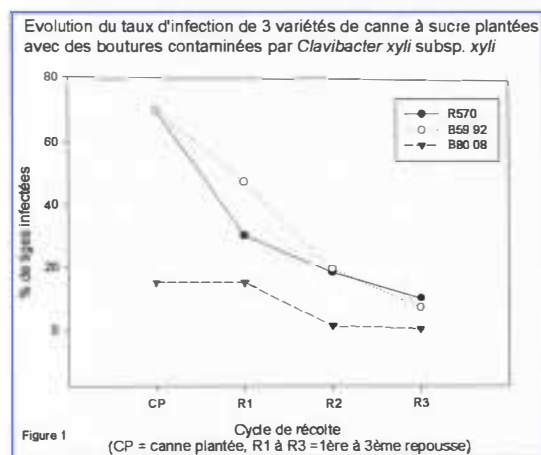
que les échantillons de SCYLV positifs sont essentiellement dus à l'infection rapide de la variété B82 139 dont 18% des tiges échantillonnées en pré-pépinières étaient contaminées (les 30 échantillons prélevés sur B82 139 en pépinière commerciale étaient tous contaminés par le virus). Parmi les autres variétés, B80 689, B59 92, R570 et R579 présentaient quelques plantes infectées par le SCYLV. Quelques cas de pourriture d'apex ont été observés et deux espèces de *Fusarium* ont été isolées à partir des échantillons prélevés.

Une étude préliminaire a débuté en novembre 2002 pour déterminer l'impact potentiel des maladies telluriques fongiques (dont la pourriture des racines due à *Pythium arrhenomanes*) sur la croissance de la canne à sucre. Les premiers résultats sont attendus pour 2003.

Le diagnostic de la maladie du rabougrissement des repousses pour la compagnie Central Romana (République Dominicaine) a été poursuivi et le risque de contamination rapide de nouvelles variétés commerciales sensibles a été démontré, notamment

lorsque les mesures sanitaires ne sont pas mises en place.

## 1.2. Analyse de l'impact des maladies sur le rendement des variétés cultivées, cas du rabougrissement des repousses (RSD).



Une étude de l'impact du RSD sur 3 variétés cultivées en Guadeloupe et en Martinique (R570, B80 08 et B59 92) a été engagée depuis 1998. Quel que soit le cycle de récolte considéré, la variété B80 08 est moins infectée que les variétés B59 92 et R570. Ces deux dernières variétés présentaient des taux de contamination des tiges similaires et variant de 70% de tiges infectées au premier cycle de récolte à 9% de tiges infectées au quatrième cycle de récolte. Les 3 variétés montrent une certaine résistance à l'expansion de la maladie, le nombre de plantes infectées diminuant au cours des cycles de récolte successifs (Figure 1). Malgré cette apparente

rémission, des pertes significatives de rendement en canne à sucre ont pu être associées à la maladie du RSD pour les variétés R570 et B59 92 (13,4% pour R570 et 12,5% pour B59 92 sur l'ensemble des 4 cycles étudiés) tandis que B80 08 n'a pas présenté de diminution de rendement due à la maladie. Les diminutions de rendements semblent notamment liées à une réduction de hauteur de tiges.

## 1.3. Epidémiologie du SCYLV

Le SCYLV est présent en Guadeloupe et les plantes peuvent être infectées dès le deuxième cycle de pépinière (pré-pépinière). Afin de mieux comprendre le mode de propagation de ce virus dans les conditions tropicales humides de la Guadeloupe un essai a

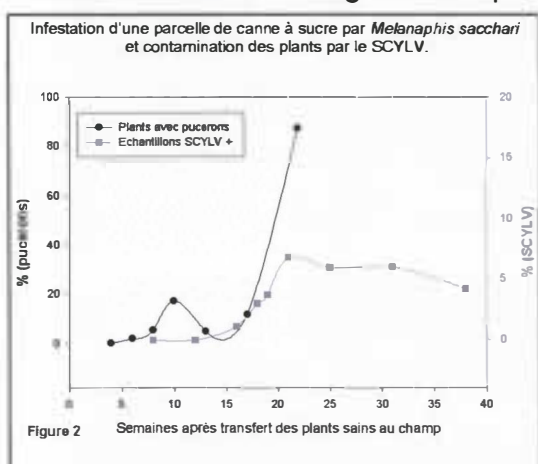




été mis en place à partir de vitro-plants sains de la variété SP71-6163, sensible à la maladie de la feuille jaune au Brésil. La parcelle a été bordée sur un côté par des cannes à sucre infectées par le SCYLV. Le puceron vecteur, *Melanaphis sacchari* est apparu très rapidement sur le feuillage, dès le premier mois après la plantation des vitro-plants. Les premiers plants de canne à sucre infectés ont été détectés après 4 mois de culture. L'accroissement du nombre de plants infectés par le



SCYLV a eu lieu de manière conjointe à l'augmentation du nombre de pucerons et du nombre de touffes hébergeant des pucerons (Figure 2). Le nombre de plants contaminés



s'est stabilisé autour de 6% après 22 semaines de culture tandis que la population de pucerons était très importante à ce moment là (87% de touffes infestées de pucerons). Les observations effectuées n'ont pas permis de mettre en évidence de relation entre la présence de puceron sur une touffe et sa contamination par le SCYLV. Cependant, les évolutions spatiales des pucerons et du SCYLV sont similaires. Au début du deuxième cycle de culture, 5 semaines après la récolte, 21% des échantillons étaient infectés par le SCYLV et 36% des touffes étaient infestées de pucerons.

#### 1.4. Perspectives.

Une veille sanitaire sera maintenue et le contrôle des pré-pépinières, étape charnière du schéma de pépinière, sera accentué.

Le rôle éventuel des *Fusarium* dans l'étiologie de la maladie de pourriture d'apex sera étudié. L'étude de l'épidémiologie du SCYLV sera poursuivie en 2003 et un deuxième essai sera mis en place pour valider les premiers résultats. Une bonne compréhension du mécanisme de contamination des plantes par le SCYLV aidera, si besoin est, à la mise en place de méthodes de lutte raisonnée.

L'impact des maladies fongiques telluriques sera appréhendé avec la collaboration de l'université de Louisiane, Baton Rouge.

## 2. Appui de la pathologie à l'amélioration variétale (opération 2).

**Objectifs :** Mise au point et application de tests de criblage pour l'évaluation de la résistance aux maladies des clones en cours de sélection afin de sélectionner et distribuer aux partenaires et aux planteurs des variétés résistantes aux maladies.

**2.1 Criblage des variétés en cours de sélection pour la résistance à l'échaudure des feuilles (*Xanthomonas albilineans*) au charbon (*Ustilago scitaminea*) et au rabougrissement des repousses (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*).**

Six séries (FR94, FR95, FR96, FR97, FR98 et FR99) sont en cours d'évaluation pour la résistance au charbon et au rabougrissement des repousses, soit 299 clones présélectionnés. Dix huit clones en fin de sélection et 15 variétés commerciales et étrangères ont aussi été inclus dans les mêmes essais. Trois de ces séries (FR97, FR98 et FR99) sont aussi en cours d'évaluation pour la résistance à l'échaudure des feuilles. Pour les essais achevés en 2002, quatre variétés de la série FR97, ainsi que les variétés FR90 714 et R575 sont sensibles à l'échaudure des feuilles, six variétés de la série FR95 et les variétés B72 191 et FR83 2034 sont sensibles au charbon et six variétés de la série FR94 et les variétés FR87 127 sont sensibles au RSD. Cinq autres variétés de la série FR97 ainsi que les variétés BJ82 119 présentent un risque de sensibilité à l'échaudure des feuilles et 12 variétés de la série FR94 et la variété FR87 1011 sont à considérer comme variétés à risques pour le RSD. Toutes ces variétés sont fortement colonisées par *X. albilineans* et/ou *C. xyli* subsp. *xyli*, même en l'absence de symptômes. Les variétés sensibles seront éliminées du processus de sélection.

## **2.2 Recherche de nouvelles méthodes de criblage pour la résistance aux maladies.**

Les essais menés sur les séries FR pour la présence du SCYLV dans la plante ont permis de montrer que la pression parasitaire est suffisante pour évaluer la résistance des variétés dans les tests de criblages actuels. La technique d'immunoempreinte pour la détection du SCYLV peut donc être utilisée pour préciser le comportement des variétés en cours de sélection, si besoin est.

Les analyses des essais de criblage précoce à l'égard du charbon (inoculation stade semis ou seedling) n'ont pas conduit aux résultats attendus. En effet, pour les clones n'ayant pas présenté de charbon au premier stade de sélection, le nombre de clones sensibles après inoculation des boutures avec *Ustilago scitaminea* est légèrement plus élevé pour les plants issus des lots inoculés au stade plantule après semis que pour les plants issus des lots non inoculés au stade plantule après semis. Un essai complémentaire est en cours pour expliquer ce phénomène. Dans l'état actuel des résultats il n'y a aucun avantage à inoculer les plantes au stade plantule après semis dans la mesure où la pression parasitaire est élevée.

## **2.3. Perspectives.**

Poursuite des tests de criblage des clones en cours de sélection. Intégration des résultats des essais dans une base de données utilisable par les généticiens et sélectionneurs.

L'effet de l'inoculation des semis de canne à sucre avec *U. scitaminea* sur le comportement de la plante (résistance) à l'égard du charbon sera contrôlé.

## **3. Epidémiologie de l'échaudure des feuilles (opération 3).**

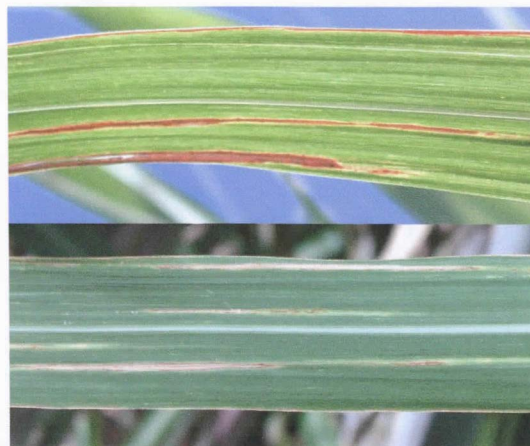
**Objectif :** Lutter contre la maladie de l'échaudure des feuilles par la création de variétés résistantes et par la définition et la mise en place de mesures sanitaires.

En 1993, puis en 1996, des symptômes atypiques d'échaudure des feuilles ont été observés dans des pépinières mères. *X. albilineans*, agent causal de l'échaudure des feuilles, a été isolé à partir de ces symptômes. Ces parcelles ont probablement été infectées après dissémination de *X. albilineans* par voie aérienne. **L'objectif des travaux est d'évaluer et de comprendre ce phénomène de contamination par voie aérienne** qui est suspecté pour l'échaudure des feuilles depuis près de 10 ans.



### 3.1. Dissémination aérienne de *X. albilineans*.

L'apparition de *X. albilineans* sur et dans la plante, ainsi que les symptômes associés, ont été suivis dans trois parcelles de canne à sucre, mises en place avec des plants sains (issus de culture *in vitro*) dans trois localités (deux sur Basse Terre, zone humide et une sur Grande Terre, zone sèche). Les premières bactéries de l'espèce *X. albilineans* ont été isolées à partir de gouttes de rosée 4 à 5 semaines avant l'apparition des premiers symptômes dans les 3 localités et lors du premier cycle de récolte (canne plantée). En revanche, la contamination des 3 parcelles étudiées ne s'est pas effectuée de façon synchrone. La rapidité de la contamination semble dépendre du climat et de la proximité de plants de canne à sucre contaminés par l'agent pathogène. Les densités de *X. albilineans* relevées dans les gouttes de rosée étaient très variables d'une parcelle étudiée à l'autre et dépendaient très certainement de la disponibilité en eau à la surface des feuilles. Les valeurs maximales observées étaient de  $5,5 \cdot 10^6$ ,  $5,6 \cdot 10^4$  et  $4,6 \cdot 10^5$  ufc/ml d'eau (eau prélevée à la surface des feuilles), en fin de saison humide sur Basse Terre (zone humide) respectivement en 1999, 2000 et 2001. Pour les mêmes périodes, ces valeurs étaient de  $3,5 \cdot 10^4$ , 2,2 et 64 ufc/ml eau, en Grande Terre (zone sèche) pour la même variété (B69 566). La contamination des tiges étaient, quant à elle, liée à la précocité d'infestation de la parcelle et de la densité des populations présentes en phase épiphyte. Elle a varié de 2 à 18% de tiges infectées en canne plantée, de 1,4 à 7% en première repousse et de 0,5 à 14% en deuxième repousse. La parcelle la moins infectée était celle mise en place en zone sèche (Nord Grande Terre), au milieu de parcelles de canne à sucre commerciales. Le processus d'infection des plantes par *X. albilineans* a été comparé chez deux variétés (B80 08 résistante à l'échaudure des feuilles et B69 566 sensible) cultivées en zone humide. Si pendant les 3 années d'observation les populations de *X. albilineans* dénombrées à la surface des feuilles étaient identiques, le taux de contamination des tiges qui s'en est suivi était différent. Les pourcentages de tiges contaminées pour la variété B80 08 étaient de 1,75, 1,35 et 3,2 % respectivement à la fin des cycles de canne plantée, première et deuxième repousses ; ils étaient respectivement de 18, 3,5 et 14% pour la variété B69 566.



### 3.2. Capacité colonisatrice et diversité génétique de *Xanthomonas albilineans*.

La variabilité de 95 souches originaires de Guadeloupe et prélevées dans les parcelles contaminées par voie aérienne a été analysée en comparant i/ la capacité des souches à produire *in vitro* la toxine 'albicidine' et ii/ les profils de restriction d'une région du génome impliquée dans la production de cette toxine. Bien que la quantité de toxine produite ait varié d'une souche à l'autre, les profils génétiques obtenus pour les souches de Guadeloupe étaient similaires. En revanche, la variabilité de cette région parmi un échantillon de souches de *X. albilineans* d'origines géographiques diverses corrobore le classement de ces souches dans les différents groupes génétiques déjà connus. Dix souches de l'agent pathogène originaires de Guadeloupe, sélectionnées pour leur production variable d'albicidine *in vitro*, ont aussi été comparées pour leur capacité à coloniser la plante après aspersion des bactéries sur le feuillage de plants de canne à sucre. Si certaines souches semblent mieux adaptées à une vie épiphyte foliaire, aucune relation entre la production *in vitro* d'albicidine et la capacité colonisatrice de la bactérie n'a pu être mise en

évidence. Toutefois, la colonisation de tiges de canne à sucre après contamination de la plante par voie épiphyte a pu être reproduite en serre.

### **3.2. Perspectives 2003.**

Etude complémentaire des conséquences d'une contamination de la canne à sucre par voie aérienne sur la qualité des boutures produites et la progression de la maladie dans une parcelle plantée avec ces boutures.

Etude de la capacité colonisatrice de *X. albilineans* et relation avec la variabilité génétique en étudiant une partie plus étendue du génome.

## **4. Divers**

### **4.1. Formation.**

*Encadrements* : Stagiaire DEA, Patrice Champoiseau, DEA de Ressources Phytogénétiques et Interactions Biologiques, Univ. Montp II/ENSAM.

### **4.2. Contribution au transfert des connaissances vers l'extérieur.**

*Séminaires, colloques* : Participation au séminaire 'WISBEN Cane Breeding', à Barbade, 22-25 octobre 2002.

*Autres* : Participation à l'organisation de la Science en Fête (24-26 novembre), Stand commun INRA, LAPRA, CTICS, CIRAD : 'De la canne à sucre au Rhum'.

### **4.3. Missions.**

*Mission coopération scientifique* : LSU (Laboratoire du Prof. Jeffrey Hoy), Baton Rouge, Louisiane, du 24 février au 2 mars 2002. Etude des agents pathogènes telluriques de la canne à sucre, pour un transfert des techniques sur la Guadeloupe.

*Mission d'appui au programme* : Philippe Rott (Cirad-ca), du 4 au 8 Mars 2002. Appui scientifique sur les travaux en cours et les nouvelles expérimentations à mener pour répondre aux problématiques locales.

### **4.4 Publications**

Daugrois J.H., Dumont V., Champoiseau P., Costet L., Boisne-Noc R. and Rott P. Aerial contamination of sugarcane in Guadeloupe by different strains of *Xanthomonas albilineans*. Accepté pour publication dans European Journal of Plant Pathology.

Daugrois J.H., Hoy J.W. and Griffin J.L., 2002. Protox inhibitor herbicide effects on *Pythium* and root rot of sugarcane. Journal American Society of Sugarcane Technologist, vol 22, p131.



## RAPPORT ANALYTIQUE :

### ➤ Opération n°1.      **Contrôle des maladies de la canne à sucre.**

**Chercheur :** Jean Heinrich DAUGROIS.  
**Techniciens :** Rosiane BOISNE-NOC, Steeve JOSEPH.  
**VAT :** Sandrine Bonotto (jusqu'au 30/08/2002), Myriam Siegwart (à partir du 01/10/2002).

### ➤ **Action n°1 :      *Suivi de l'évolution phytosanitaire de la canne à sucre en Guadeloupe et dans les Caraïbes.***

Objectifs : Etude phytosanitaire du schéma de pépinière et des plantations de Guadeloupe.

#### ⚡ **Diagnostics phytosanitaires effectués à la demande de la profession :**

En cette année humide, de nombreux cas d'échaudure des feuilles (variété B69 566) et de Pokkah Boeng (variété B80 689 et R570) ont été observés ainsi que quelques cas critiques de dégâts de foreurs de tige.

#### ⚡ **Diagnostics pépinières :**

Contrôle de l'état sanitaire du schéma de pépinière, réalisé en collaboration avec le CTICS et le SPV.

#### **Maladies recherchées :**

L'échaudure des feuilles (agent causal : *Xanthomonas albilineans*), le rabougrissement des repousses (a. c. : *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*) et le syndrome des feuilles jaunes (agent impliqué : le virus de la feuille jaune ou SCYLV, '*Sugarcane Yellow Leaf Virus*') par diagnostic immunologique et autres maladies par diagnostic visuel.

#### **Méthode de diagnostic immunologique :**

La technique de diagnostic utilisée est l'immunoempreinte de tissus (TBIA ou Tissue Blot Immuno Assay) par empreinte d'un échantillon végétal sur membrane de nitrocellulose. Pour chaque variété testée dans une parcelle donnée, 30 à 40 échantillons de tiges de 1 cm de diamètre ont été prélevés dans le bas de tige pour le diagnostic de *C. xyli xyli* et *X. albilineans* et un échantillon de nervure centrale de jeune feuille pour le diagnostic du SCYLV. Pour chaque plante échantillonnée, 3 empreintes ont donc été effectuées pour le diagnostic des 3 maladies concernées par le diagnostic immunologique.

#### **Résultats :**

En 2002, 36 pépinières étaient concernées par ce contrôle (9 pépinières mères, 18 pré-pépinières et 9 pépinières commerciales).

Résultats des sondages effectués dans les pépinières en 2000 et 2002 pour le diagnostic par immuno-empreintes du rabougrissement des repousses (RSD), de l'échaudure des feuilles et du syndrome du jaunissement des feuilles (SCYLV). Les résultats indiquent le nombre d'échantillons positifs sur le nombre total d'échantillons effectués.

	RSD		Echaudure des feuilles		SCYLV	
	2000	2002	2000	2002	2000	2002
Pépinières mères	0/120	0/270	0/80	0/270	1/160	0/270
Pré-pépinières	7/1520	1/540	46/1560	18/540	121/1560	21/540
Pépinières commerciales	0/440	0/270	11/440	0/270	23/440	38/270

## Conclusion :

Le **rabougrissement des repousses** est bien contrôlé par le schéma de pépinière d'autant que cette maladie est présente dans certaines parcelles commerciales de Guadeloupe.

Quant à **l'échaudure des feuilles**, en conditions climatiques favorables (forte humidité) une contamination des parcelles ne peut pas être évitée. En revanche, il est nécessaire de contrôler le taux de contamination et la résistance des clones sélectionnés pour éviter une aggravation de l'état actuel. En 2000, les variétés les plus contaminées sont B69 379 (sensible à l'échaudure des feuilles) et B82 139. En 2002, B69 379 n'était pas dans les pépinières échantillonnées et la majorité des échantillons positifs est due à la variété B69 566 (sensible). Les études menées sur l'échaudure des feuilles, décrites par ailleurs, montrent que les variétés sensibles peuvent être contaminées très rapidement et à un taux relativement élevé lorsqu'elles sont plantées en zone humide, à proximité d'autres parcelles de canne à sucre. L'observation de plants de B69 566 infectée par *X. albilineans* sur la Basse Terre n'est donc pas surprenante, d'autant que B69 566 est une variété sensible.

Le **SCYLV** a été détecté sur la plupart des variétés échantillonnées en 2000 et 2002 (B82 139, B69 379, R579, R570, B59 92 ...). La variété la plus contaminée lors des 2 échantillonnages réalisés est B82 139 dont les 30 échantillons prélevés en pépinière commerciale en 2002 étaient positifs.

**Autres maladies** : quelques cas de pourriture d'apex et de Pokkah Boeng ont été observés dans plusieurs pépinières. Deux espèces de *Fusarium* ont été identifiées à partir de 3 isolats issus de plantes montrant de la pourriture d'apex. Quelques touffes de stries chlorotiques ont aussi été observées dans une pré-pépinière de R579.

## ↪ Perspective 2003 :

Une veille sanitaire sera maintenue et le contrôle sanitaire des pépinières sera concentré sur les pré-pépinières, étape charnière du schéma de pépinière.

Le rôle éventuel des *Fusarium* dans l'étiologie de la pourriture d'apex sera étudié.

**➤ Action n°2 : Analyse de l'impact des maladies sur le rendement des variétés cultivées, étude de l'impact du rabougrissement des repousses sur les rendements.**

Objectifs : Evaluer l'impact des maladies majeures et des nouvelles maladies sur la production de canne à sucre.

C'est dans ce cadre qu'une étude a été menée sur la maladie du rabougrissement des repousses dont l'agent causal est *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. Cette maladie ne présente aucun symptôme particulier et se propage par les boutures et les instruments de coupe. Au niveau mondial, les pertes de rendements globales estimées, liées à cette maladie, étaient de 5 à 10% mais peuvent dans certaines conditions atteindre 30%. Ces pertes seraient liées à la sensibilité des variétés cultivées et aux quantités de bactéries présentes dans la tige de canne à sucre.

**🔗 Descriptif de l'essai :**

Réalisation : Date de début : Novembre 1997,  
Date de fin : Février 2002.

Variétés : R 570, B 80 08, B 59 92.

Origine : Les boutures sont, à l'origine, issues de pépinière mère. Ces boutures ont été inoculées soit avec de l'eau soit avec une suspension de *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. Les boutures issues de la première repousse, âgée de 7 mois, de ces parcelles ont servi pour la plantation de l'essai.

Traitements : Plants issus de parcelles infectées et de parcelles saines.

Descriptif : Split plot de 6 blocs, avec les variétés en parcelle principale et les traitements en parcelle secondaire. La parcelle élémentaire est de 27 m<sup>2</sup>, soit 3 lignes de 6 m.

Plantation : Novembre 1997. Une ligne de canne par sillon, soit environ 4 tonnes de boutures à l'hectare.

Récoltes : Canne plantée (CP) du 1 au 8 février 1999.  
Première repousse (R1) 20 au 24 mars 2000.  
Deuxième repousse (R2) 21 au 25 février 2001.  
Troisième repousse (R3) 12 et 13 mars 2002.

Diagnostic du RSD : Par TBIA d'un échantillon de tige prélevé sur 30 tiges par parcelle lors de chaque récolte.

**🔗 Méthodes :**

Inoculum : La préparation de l'inoculum ainsi que le protocole d'inoculation figurent dans le Rapport Technique CPER 1999.



**Diagnostic :** La technique de diagnostic utilisée est l'immunoempreinte de tissus (TBIA ou tissue blot immuno assay) obtenue par centrifugation.

**Préparation du matériel :**

La membrane de nitrocellulose (8,5 x 11,5 cm) est déposée sur 2 feuilles de papier Whatmann 3MM et insérée entre 2 plaques de plexiglass de 1 cm d'épaisseur. La plaque supérieure est percée de 30 puits de 1 cm de diamètre.

**Echantillonnage :**

La partie basse de tige est prélevée au hasard sur 30 tiges par parcelle. Une section nette est effectuée à 4 cm au-dessous du nœud. Un échantillon de tige de 1 cm de diamètre est prélevé au centre de la section, en direction du nœud. Une section de 1 cm de long est obtenue à l'aide d'une guillotine constituée de 2 lames de rasoir montées parallèlement. La carotte obtenue est déposée dans un puits du support en plexiglas. Le support, une fois rempli, est centrifugé à 1500 g pendant 15 minutes. Après centrifugation, la membrane de nitrocellulose est retirée du montage puis séchée pendant une nuit sous la hotte à flux laminaire.

**Révélation des membranes :**

1. La membrane sèche de nitrocellulose (NC) est incubée 60 min dans une solution de blocage (TBS : Tris Buffer Saline, 20mM, pH 7.5, 3% BSA),
2. La membrane NC est incubée pendant 90 min dans une solution d'anticorps anti Cxx (Cxx Goat IgG 1/5000, TBS, 1% BSA). Après incubation, la membrane NC est lavée 3 fois dans du TBS Tween (0.05%).
3. La membrane NC est incubée pendant 60 min dans une solution de Rabbit antiGoat IgG conjugué avec de la phosphatase alcaline (conjugate IgG1/8000, TBS, 1% BSA). Après incubation, la membrane NC est lavée 3 fois dans du TBS Tween (0.05%).
4. Les complexes antigènes/anticorps sont détectés par une coloration bleu foncé après 5 à 10 minutes d'incubation dans une solution contenant le substrat (NBT/BCIP - 3mg/2mg - dans 20 ml d'une solution de diéthanamine - 10% - pH 9.8). La réaction enzymatique est stoppée en trempant la membrane NC dans une solution d'eau distillée.

Par la suite, le nombre de faisceaux colonisés est dénombré pour chaque empreinte de tige.

**Relevé de données agronomiques :**

Après 8 à 10 mois de culture, les tiges sont dénombrées sur la ligne centrale de chaque parcelle. Sur 30 tiges de cette ligne sont mesurés le diamètre et la hauteur. Les parcelles ont été récoltées et pesées après 15 mois de culture en canne plantée, 13 mois de culture en première repousse, 11 mois de culture en deuxième repousse et 12 mois de culture en troisième repousse.

**Analyses statistiques :** Les analyses sont effectuées sur les moyennes des parcelles à l'aide du logiciel SAS, avec les procédures univariate, anova, glm.

## 🔗 Résultats et Discussion :

### Impact du RSD sur des caractéristiques agronomiques :

**Impact sur le tallage :** tout au long des 4 cycles de culture, le rabougrissement des repousses n'a pas eu d'effet négatif sur le tallage sur l'ensemble des variétés. En 2<sup>ème</sup> repousse, le rabougrissement des repousses a eu un effet négatif sur le tallage, non significatif sur l'ensemble des variétés, mais significatif au seuil de 5 % pour la B 59 92. Cet effet n'apparaît plus en 3<sup>ème</sup> repousse, cycle de récolte pour lequel on observe une forte variabilité du nombre de tiges entre les parcelles ayant subi un même traitement, variabilité qui peut masquer l'impact du RSD sur le tallage.

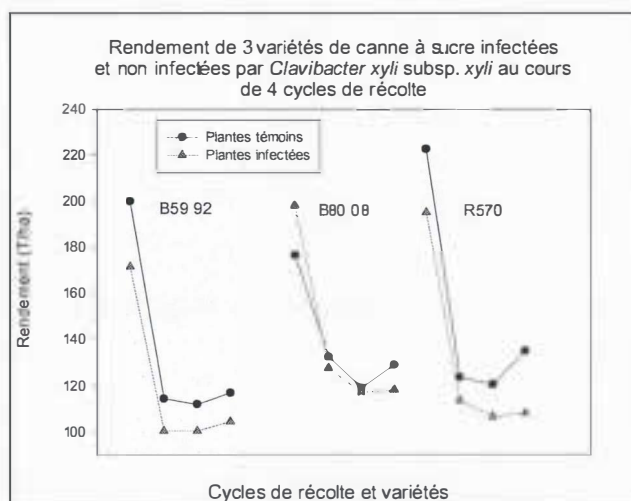
**Impact sur la hauteur des tiges :** le rabougrissement des repousses a eu un effet négatif significatif au cours des différents cycles de récolte sur l'ensemble des variétés testées. Après 10 mois de croissance, la hauteur **diminue de 3 à 8%** suivant le cycle de récolte. Cependant, l'absence d'interaction entre les variétés et la maladie ne permet pas d'établir de différence de comportement des 3 variétés vis-à-vis du RSD quand à la hauteur des tiges.

**Impact sur le diamètre :** sur l'ensemble des variétés, le RSD a eu un impact négatif significatif sur le diamètre des tiges en 1<sup>re</sup> repousse. Aucun effet significatif n'est apparu au cours du cycle de canne plantée, de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> repousse. Néanmoins, les diamètres moyens des parcelles issues de boutures infectées sont généralement inférieurs aux diamètres moyens des parcelles témoins.

**Impact sur la qualité (richesse) :** Aucune diminution de la qualité des cannes à sucre à la récolte, liée à la maladie du rabougrissement des repousses, n'a été observée au cours de cet essai.

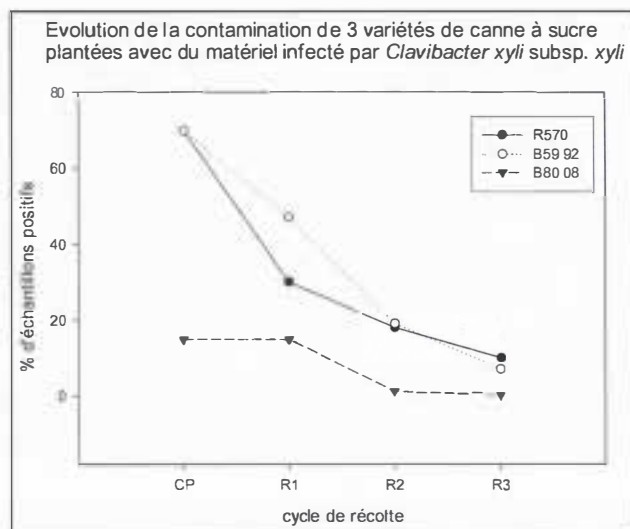
### Impact sur les rendements en canne :

Les rendements en canne à sucre de B59 92 et R570 sont affectés par la maladie. En effet la perte globale sur les 4 cycles de récolte est respectivement de 12,5%, 1,8% et 13,4% pour B59 92, B80 08 et R570. Cette diminution de rendement est significative seulement pour B59 92 et R570. La maladie n'a pas eu d'effet sur la variété B80 08. Les pertes observées pour B59 92 et R570 varient entre 8 et 20% au cours des différents cycles de récolte étudiés.



### Contamination des tiges par *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*

Quelque soit le cycle observé, la variété B80 08 est moins infectée que les variétés B59 92 et R570. Ces dernières ont des taux de contamination similaires (variant de 70% de tiges positives au premier cycle de récolte à 9% de tiges positives au quatrième cycle de récolte). Par contre, on observe pour les 3 variétés étudiées, une baisse régulière du nombre d'échantillons contaminés par *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* le nombre de plantes positives diminuant au cours des cycles successifs de récolte.



### 🔗 Conclusion :

Les résultats obtenus pour les 4 cycles de récolte étudiés montrent que parmi ces 3 variétés, B 80 08 est la plus résistante, que ce soit pour la contamination des tiges par l'agent pathogène ou les effets de la maladie sur les rendements. En revanche, le nombre de diagnostics positifs diminue, pour les 3 variétés étudiées, au cours des cycles successifs. Les 3 variétés concernées montrent donc une certaine résistance à l'expansion de la maladie. Malgré cette résistance, des **pertes significatives de rendement** en canne à sucre **ont pu être associées à la maladie du RSD pour les variétés R570 et B59 92** (respectivement 13,4% et 12,5% sur l'ensemble des 4 cycles étudiés) alors que B80 08 ne présente pas de diminution de rendement due à la maladie. Les diminutions de rendements observées semblent liées à une réduction longitudinale de croissance de la tige. Si le rabougrissement a un impact sur le diamètre des tiges, celui-ci n'a pas été clairement identifié dans cet essai.



### ➤ Action n°3 : Epidémiologie du SCYLV

Objectif : Etudier la propagation du SCYLV (*Sugarcane Yellow Leaf Virus*) en conditions naturelles, dans une parcelle saine à la plantation et bordée d'un côté par deux lignes de canne infectée par cette maladie. L'infestation est reliée à la dynamique de la population de pucerons qui sera suivie tout au long des observations.

La variété de canne choisie pour cet essai est la SP71-6163. C'est une canne particulièrement sensible au SCYLV, qui se propage rapidement dans toute la plante. C'est sur cette variété que les plus gros dégâts en terme de rendements ont été observés au Brésil.

#### Quelques généralités :

Des symptômes de jaunissement des feuilles, accompagnés d'une plus ou moins forte baisse de rendement ont été signalés à Hawaï en 1988 et vers le début des années 1990 au Brésil. En 2000 la maladie des feuilles jaunes (anciennement YLS ou Yellow Leaf Syndrome) a été observée dans plus d'une vingtaine de pays répartis sur tout le continent.

Le symptôme principal de cette maladie est le jaunissement plus ou moins prononcé de la nervure centrale de la face inférieure des feuilles, le limbe restant généralement vert. Dans le cas de la variété SP71-6163, on observe un jaunissement de la nervure face inférieure, et une coloration violette de cette même nervure, face supérieure. Le jaunissement n'est pas spécifique de la maladie, il peut être induit par un déséquilibre nutritionnel, un stress hydrique ou thermique, l'initiation florale, l'approche de la maturité.... Il est donc difficile de détecter la maladie sur de seuls critères visuels.

Un des agents causals de la maladie des feuilles jaunes est un lutéovirus à ARN simple brin, appelé le Sugarcane Yellow Leaf Virus ou SCYLV. Des phytoplasmes pourraient aussi générer cette maladie.

Le virus est essentiellement disséminé par la plantation de boutures infectées (cas des deux lignes de FR 90 714 dans l'essai). Certains insectes peuvent aussi être vecteurs du SCYLV. Le virus est alors transmis selon le mode circulant persistant par des pucerons.

### DESCRIPTIF DE L'ESSAI :

Localisation de la parcelle : Lieu-dit Saint-Jean (Petit-Bourg)

#### Matériel végétal :

\*FR90 714. Les boutures sont issues de tiges contaminées par le SCYLV, prélevées la veille sur la pépinière d'essai 01M51 de Roujol, Petit-Bourg (traitement par thérapie avant plantation en pépinière).

313 tronçons de 2 à 3 yeux ont été plantés.

\*SP71-6163 RM2, 2 lots (n°1 et n°8) de vitroplants assainis du virus par culture de méristème au laboratoire de Roujol. L'absence de SCYLV a été contrôlée par RT-PCR (à Montpellier). Ces plants ont été multipliés *in vitro* à Roujol pour en obtenir 2000, puis sevrés en serre pendant deux mois (traitements insecticides en serre avec deux insecticides). Une deuxième vérification RT-PCR a été réalisée au moment de la plantation.

2000 vitroplants de cette variété, exempts de SCYLV, ont été implantés dans l'essai.

Descriptif : ♦ 2 lignes de 40 mètres plantées en boutures infectées par le SCYLV. 313 tronçons de canne ont été utilisés.

◆ 18 lignes de 40 mètres plantées en vitroplants sains. (9 lignes pour le lot n°1 soit 995 plants, 9 lignes pour le lot n°2 soit 992 plants). Chaque ligne de vitroplants comprend en moyenne 110 plants.

Date de plantation : 5 décembre 2001.

Traitements au champ :

- Fumure : 1 seul épandage d'engrais au moment de la plantation, la canne poussant très vite, elle n'a pas reçu d'autre engrais.
- Désherbage : 3 désherbages chimiques à 3, 9 et 17 semaines, plusieurs passages pour arracher manuellement les herbes de Guinée. Un griffage à environ 6 semaines.
- Pas d'autres traitements, aucun insecticide n'a été utilisé pour ne pas interférer avec le développement de la population de pucerons et de leurs prédateurs (coccinelles, araignées, fourmis...).

## **METHODES :**

### **A-Recherche du SCYLV**

#### **◆Diagnostic :**

La technique de diagnostic utilisée est l'immuno-empreinte de tissus (TBIA ou tissue blot immuno assay).

#### **◆Echantillonnage :**

L'échantillon correspond à la première feuille de la tige à ochréa visible. La nervure est sectionnée à la base et imprimée sur une membrane de nitrocellulose, par pression manuelle de 1 à 2 secondes. Les membranes sèchent une nuit sous une hotte à flux laminaire. Le virus sera détecté par une coloration violette des faisceaux du phloème après révélation des membranes.

#### **◆Révélation des membranes :**

- Trempage de la membrane de nitrocellulose dans du tampon TBS + BSA 3% pendant 1 heure pour bloquer la réaction.
- Incubation de la membrane 1h30 dans une suspension d'anticorps anti-SCYLV au 1/10 000ième dilué dans le tampon TBS + BSA 1% + Tween 0,05%. L'anticorps va se fixer sur le virus s'il est présent. La membrane est ensuite lavée 3 fois dans du TBS Tween 0,05%.
- Incubation de la membrane 1h dans le conjugué phosphatase alcaline anti-globuline de lapin (anti-rabbit) au 1/10 000ième dilué dans du tampon TBS + BSA 1%. Le conjugué va se fixer sur l'anticorps anti-SCYLV. La membrane est ensuite lavée 3 fois dans du TBS Tween 0,05%.
- Les complexes antigènes-anticorps sont révélés par une coloration violette à l'intérieur des faisceaux du phloème, après trempage de la membrane dans le substrat BCIP + NBT dilué dans une solution de diéthanolamine. La réaction enzymatique est stoppée en trempant la membrane dans de l'eau distillée.

#### **◆Organisation des prélèvements :**

##### **a-Recherche du SCYLV sur la variété FR90 714**

Six semaines après la plantation, nous avons prélevé un échantillon de feuilles sur les touffes de ces deux lignes supposées atteintes par le SCYLV.

### *b-Recherche du SCYLV sur la variété SP, à l'échelle de la parcelle*

Dix prélèvements ont été réalisés à intervalles de temps adaptés en fonction de l'évolution de l'infestation. La première feuille à ochréa visible est prélevée sur une grande tige de la touffe, ou, le cas échéant sur la tige où des pucerons ont été observés. Une feuille toutes les 10 touffes est prélevée sur l'ensemble des 18 lignes, soit un total de 200 feuilles environ pour chaque prélèvement. Le numéro de la touffe de départ de prélèvement est décalé d'une ligne à l'autre afin de mieux répartir l'échantillonnage sur la parcelle, et d'une date de prélèvement à l'autre afin de pouvoir tester des touffes différentes à chaque fois.

Pour le 9<sup>ème</sup> prélèvement, la totalité des touffes de SP 71 6163 ont été testées, à raison de une feuille par touffe, afin d'avoir une image réelle de la contamination à cette date.

Les prélèvements suivants ont repris le principe initial : un échantillon de 200 feuilles (composé de une feuille prélevée toutes les 10 touffes sur les 18 lignes).

### *c-Recherche du SCYLV dans la variété SP, à l'échelle de la touffe*

Pour l'analyse précédente, nous n'avons prélevé qu'une seule feuille par touffe. Nous avons voulu vérifier si le résultat obtenu sur cette unique feuille était représentatif de l'état phytosanitaire de l'ensemble de la touffe.

Pour cela, nous avons sélectionné au hasard, et au vu de l'analyse du précédent échantillonnage (à 22 semaines) :

- 16 touffes pour lesquelles l'analyse de la feuille s'est révélée positive,
- 19 touffes pour lesquelles l'analyse de la feuille était négative

Nous avons ensuite prélevé la première feuille à ochréa visible sur l'ensemble des tiges bien développées de chaque touffe correspondante. Ce prélèvement a été effectué sitôt le résultat de l'échantillonnage obtenu, avant que l'état phytosanitaire de la canne évolue au champ.

## **B-Suivi de la population de pucerons**

### ♦ Observations de la localisation des pucerons et du nombre de touffes hébergeant des pucerons :

Sept observations ont été réalisées, à 4, 6, 8, 9, 13, 17 et 22 semaines.

L'ensemble des feuilles de chaque tige de la touffe est minutieusement examiné, aussi bien sur la face inférieure que sur la face supérieure. En parallèle, observation des populations de coccinelles, prédateurs du puceron.

Dans un premier temps, toutes les touffes ont été examinées (de l'observation 1 à 5, soit jusqu'à la 13<sup>ème</sup> semaine). Puis, la canne devenant trop grande (trop grand nombre de feuilles sur l'ensemble des 2000 touffes), nous n'avons effectué l'observation que toutes les 3 lignes, soit sur 6 lignes au total, représentatives de l'évolution moyenne de la population sur la parcelle.

Pour le dernier passage, nous nous sommes limités à une observation minutieuse de toutes les feuilles sur une touffe sur quinze, et sur les 6 lignes précédemment sélectionnées.

### ♦ Comptage des pucerons sur les touffes :

Le comptage a été fait sur échantillon lors des observations 1, 4, 5, 6 et 7. Les pucerons sont comptés un par un sur les feuilles où ils ne sont pas trop abondants (< 300), sinon, une estimation est faite. Pour cela, les pucerons sont comptés sur une petite surface, et on compte combien de fois cette petite surface se retrouve représentée sur la feuille.



#### Prélèvements d'échantillons :

Neuf prélèvements de pucerons ont été effectués, dans une même colonie ou en mélange provenant de plusieurs touffes. Il sont conservés en tubes à hémolyse dans de l'alcool à 90° (dilution à partir d'éthanol absolu).

## RESULTATS

### A-Recherche du SCYLV

#### a-Résultats de l'analyse sur la parcelle entière

#### Evaluation du degré de contamination de la parcelle :

Date	Semaine	nb feuilles SCYLV +	nb feuilles prélevées	% feuilles SCYLV+
22,23/01/02	8	0	193	0,0
20,21/02/02	12	0	182	0,0
18/03/02	16	2	182	1,1
04,05/04/02	18	6	203	3,0
11,12/04/02	19	7	190	3,7
19,22/04/02	20,5	16	191	8,4
25,26/04/02	21,5	10	190	5,3
13,14/05/02	24	5	199	2,5
21,28/07/02	25	113	1879	5,9
2,3,4,07/02	31	11	184	6.0
22/08/02	38	2	48	4.2

Les premiers résultats positifs apparaissent au cours du 4<sup>ème</sup> mois après plantation (12 à 16 semaines). Le taux de contamination reste faible (maximum 8%) et oscille autour de la valeur moyenne de 6%, valeur réelle à 25 semaines, obtenue en analysant toutes les touffes de la parcelle. Les résultats en dents de scie sont probablement l'effet du hasard de l'échantillonnage.

#### Observation de la répartition de la contamination

Une tendance semble se dessiner dans l'évolution de l'infestation, dès la 4<sup>ème</sup> observation (semaine 18). Les contaminations sont plus nombreuses dans le triangle sud-ouest délimité par la diagonale de la parcelle, les deux bandes contaminées au sud, et le chemin à l'ouest. Le vent soufflant de façon constante dans la direction est vers ouest pourrait expliquer cette répartition. Il pousserait des pucerons ayant acquis le virus en piquant les cannes des lignes 1 et 2 vers le centre et l'ouest de la parcelle.

De la 20<sup>ème</sup> à la 24<sup>ème</sup> semaine, se dessinerait un autre foyer de contamination, en cercle, dans le quart nord-est de la parcelle. Ce foyer se trouve ensuite englobé par les nouvelles contaminations.

*La diagonale qui délimite le précédent triangle se déplace au fur et à mesure pour devenir plus horizontale, son point de départ étant toujours l'angle sud-est de la parcelle.*

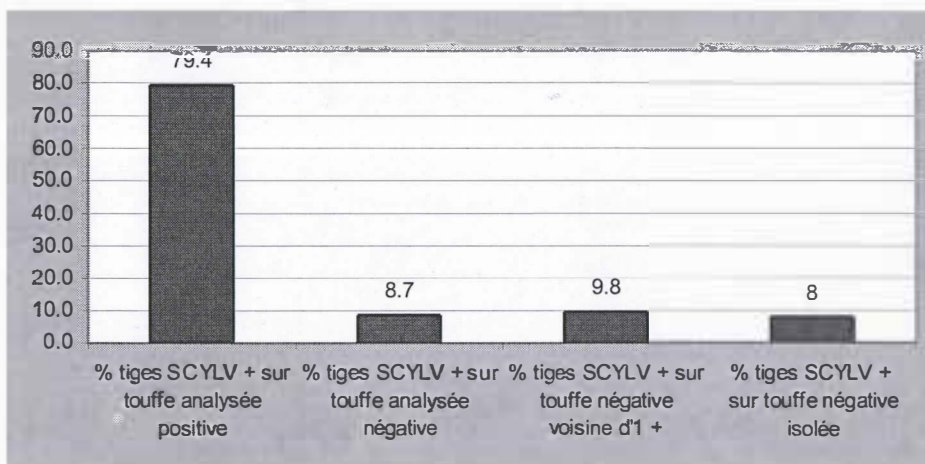
## b-Résultats de l'analyse sur les touffes

Les différents échantillonnages ont été réalisés en prélevant une seule feuille par touffe. Nous avons voulu vérifier si le résultat obtenu sur cette unique feuille était représentatif de l'état phytosanitaire de l'ensemble de la touffe.

Pour cela, nous avons sélectionné au hasard, et au vu de l'analyse du précédent échantillonnage (à 22 semaines) :

- 16 touffes pour lesquelles l'analyse de la feuille échantillonnée s'est révélée positive,
- 19 touffes pour lesquelles l'analyse de la feuille échantillonnée était négative.

Nous avons ensuite prélevé la feuille du premier ochréa visible sur l'ensemble des tiges de chaque touffe correspondante. Ce prélèvement a été effectué sitôt le résultat de l'échantillonnage habituel obtenu, avant que l'état phytosanitaire de la canne évolue au champ.



Le pourcentage de tiges SCYLV (+) est sensiblement le même (de l'ordre de 9%) sur des touffes testées sur une tige SCYLV (-) isolées ou sur des touffes SCYLV (-) voisines d'une touffe SCYLV (+).

Ce pourcentage, révélateur du risque de ne pas échantillonner la tige infectée, et de noter une touffe SCYLV (-) alors qu'une tige au moins peut être contaminée par le virus (jusqu'à 9% de la touffe), s'équilibre avec le risque inverse d'échantillonner une tige négative alors que la touffe est infectée à 80%.

## c-Recherche de symptômes au champ

Les symptômes ne sont apparus que tardivement, bien après la détection du virus par TBIA. Ce n'est qu'à la 24<sup>ème</sup> semaine (6 mois) après plantation que le premier symptôme est apparu sur la ligne contiguë aux bandes contaminées. Les colorations violettes et jaunes de la nervure, typiques de cette maladie sur cette variété, étaient bien visibles. Un mois plus tard, de nouveaux symptômes, plus discrets, étaient visibles sur une autre touffe, toujours située sur cette même ligne. Cependant, ces symptômes restent rares ou très peu visibles.

## **B-Suivi de la population de pucerons**

### a-Identification des pucerons

A partir des observations au champ (localisation sur la plante), des observations à la loupe binoculaire, et avec l'aide d'un entomologiste du CIRAD (M. Bernard Vercambre), nous avons pu identifier deux sortes de pucerons dans notre parcelle.

Le plus fréquent est *Melanaphis sacchari* (famille des Aphididae, sous famille des Aphidinae, tribu des Aphidini). C'est un puceron couleur crème à jaunâtre de 1,1 à 2 mm de long, que l'on peut rencontrer essentiellement sur des graminées (sorgho, canne à sucre), aussi bien sous la forme aptère qu'ailée. Il est largement représenté dans les zones tropicales et subtropicales.

Le puceron *Sipha flava* (famille des Aphididae, sous famille des Chaitophorinae, tribu des Atheroidini) est moins abondant dans la parcelle, et n'est apparu qu'à une période de l'année, entre les observations 3 et 6 soit entre 8 et 17 semaines. Il est caractérisé par une couleur jaune vif et par la présence de poils sur l'abdomen, on peut l'observer sous la forme aptère et ailée. Nous n'avons pas observé de *Ropalosiphum maidis*. De façon générale, *Melanaphis sacchari* et *Ropalosiphum maidis* sont des pucerons observés dans les cultures de canne à sucre. *Melanaphis sacchari* est le meilleur vecteur du SCYLV, *Ropalosiphum*, le transmet aussi, mais de façon moins efficace. En revanche, *Sipha flava* serait incapable de le transmettre. Nous nous intéresserons donc seulement au suivi des populations de *Melanaphis sacchari*.

#### b-Localisation des pucerons sur la plante

*Melanaphis sacchari* est situé sur la face inférieure des feuilles. A de rares exceptions près, il a toujours été observé sur les feuilles âgées, au bas de la tige, et ce, quelque soit l'âge de la plante.

Selon l'abondance de ce puceron dans la parcelle, on observe des individus isolés (aptère ou ailés), des regroupements en petites colonies (d'une dizaine à une cinquantaine d'individus), ou en gros amas de plusieurs centaines d'individus où il est impossible de différencier des colonies.

#### c-Evolution de la population de *Melanaphis sacchari*

Numéro d'observation	obs 1	obs 2	obs 3	obs 4	obs 5	obs 6	obs 7
Date (semaines)	4	6	8	10	13	17	22
nb plants puceronnés/parcelle	3	34	102	301	125	222	1645,7
% plants puceronnés sur la parcelle	0,2	2	5,5	17,2	4,9	11,8	87,2
nb de pucerons/touffe	10	nd*	nd	51,1	6,1	3,9	68,8
nb total de pucerons	30	nd	nd	15381,1	762,5	865,8	113224,2
écart-type (nb pucerons touffes)	5	nd	nd	71	7	5	167,9
nb total de pucerons lignes SCYLV+	0	0	nd	1450	67	351	nd
nb pucerons/touffes lignes SCYLV+	0	0	nd	45,31	9,57	18,47	nd

nd : non déterminé

#### ♦ Localisation des populations sur la parcelle

Les premiers pucerons apparaissent rapidement dans la parcelle, un mois seulement après plantation, sur des vitroplants qui commencent tout juste à se



développer. Jusqu'à l'observation 4 (10 semaines après plantation), les pucerons se rencontrent en majorité dans un triangle au sud-ouest de la parcelle. Ils semblent provenir de la parcelle de canne adulte qui la borde au sud, et être disséminés par le vent dominant vers l'ouest / nord-ouest. Au delà de cette date, toute la parcelle est envahie plus ou moins régulièrement. Au bout de 22 semaines, l'envahissement de la parcelle est quasi total (87%), et le nombre de pucerons est très important (plus de 100 000).

#### ◆ Taille de la population

La courbe de l'évolution de la population de pucerons montre deux pics d'infestation, à 10 et 22 semaines. Jusqu'à 10 semaines, la population augmente, parallèlement, on observe de plus en plus de coccinelles dans la parcelle. A 10 semaines, le nombre de prédateurs semble très important, ils exercent sûrement une forte pression sur la population de pucerons qui commence alors à diminuer. La nourriture devenant moins abondante, les coccinelles diminuent. Puis, nous avons un deuxième pic pour les deux populations.

Les 3 courbes « nombre de plants puceronnés », « nombre de pucerons par touffe » et « nombre total de pucerons » évoluent de la même manière. Plus on a de pucerons dans la parcelle, plus on a de touffes infestées et de pucerons sur chaque touffe. Ce qui semble signifier que les pucerons, non seulement se multiplient au sein de la parcelle, mais se déplacent facilement d'une touffe à l'autre. Le risque de transmission du virus est donc plus élevé que si l'augmentation ne correspondait qu'à une évolution de la taille de la colonie sur la touffe. Nous avons en effet trouvé à chaque passage des pucerons ailés. Lorsque les colonies sont de grande taille (supérieur à 200), il y a toujours au moins un puceron ailé.

### C-Relations entre la contamination au SCYLV et la population de pucerons

Il n'y a pas de relation apparente entre les touffes SCYLV+ et celles où nous avons observé des pucerons.

Cependant, le virus a plus de chances d'être transmis par un puceron ailé (qui peut se déplacer d'une canne infectée à une canne saine) que par un puceron aptère dont le déplacement est plutôt limité aux touffes adjacentes. De plus, il n'est pas sûr que la descendance d'un puceron ayant acquis le virus le possède elle aussi.

Nos observations sont ponctuelles, et il est plus difficile de remarquer les ailés que les colonies d'aptères. Aussi, nous ne pouvons pas savoir à quel moment une touffe SCYLV+ a pu être contaminée par un puceron porteur du virus.

### Conclusion

L'apparition du SCYLV sur la variété SP, saine à la plantation, est rapide. Le virus est détecté dès 4 mois. Par contre le degré de contamination reste faible et semble se stabiliser autour de 6%, ce qui est plutôt encourageant pour la production locale de canne. Pourtant la population de pucerons est importante, et au vu du dernier pourcentage d'infestation (87% à une date donnée), nous pouvons supposer que chaque touffe a hébergé à un moment donné un ou plusieurs pucerons, aptères ou ailés. Bien qu'on sache que le puceron *Melanaphis* soit vecteur du virus, nous ne pouvons pas donner de relation directe entre sa présence sur une touffe et l'apparition de la maladie. Dans la plupart des cas, nous n'avons pas vu de pucerons sur les touffes où nous avons détecté la maladie.

Cependant, l'évolution géographique de l'apparition des pucerons et de celle du SCYLV sont similaires, et le palier de 6% de touffes malades apparaît conjointement au pic d'envahissement par les pucerons.

Les observations seront poursuivies en première repousse.

## ➤ Opération n°2.      Appui de la pathologie à l'amélioration variétale.

**Chercheur :** Jean Heinrich DAUGROIS.  
**Techniciens :** Rosiane BOISNE-NOC, Steeve JOSEPH.  
**VAT :** Sandrine Bonotto (jusqu'au 30/08/2002), Myriam Siegwart (à partir du 01/10/2002).

### ➤ Action n°1 :      ***Criblage des variétés en cours de sélection pour la résistance aux principales maladies.***

**Objectifs :** Application des tests de criblage pour l'évaluation de la résistance aux maladies des clones en cours de sélection afin d'éviter de sélectionner et de distribuer aux partenaires et aux planteurs des variétés trop sensibles.

#### **Descriptif de l'action :**

Les variétés en cours de sélection au CIRAD sont actuellement testées pour leur résistance au charbon (*Ustilago scitaminea*), à l'échaudure des feuilles (*Xanthomonas albilineans*) et au rabougrissement des repousses (*Clavibacter xyli* subsp. *xyli*).

L'échaudure des feuilles, dont l'agent causal est une bactérie vasculaire (*X. albilineans*) est une maladie qui comporte des phases de latence, sans expression de symptômes, alors que l'agent pathogène est présent dans la plante. Afin de garantir une résistance suffisante des variétés en cours de sélection, un indexage des clones est effectué après inoculation avec comme base de criblage la symptomatologie et l'intensité de colonisation des plantes par la bactérie.

Le rabougrissement des repousses est une maladie bactérienne vasculaire dont l'agent causal est *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*. Cette maladie ne présente aucun symptôme caractéristique et les infections ne peuvent être déterminées que par diagnostic spécifique. Cette maladie se propage lors du bouturage ou de la coupe. Les techniques de lutte consistent à limiter l'extension de la maladie en suivant les préconisations sanitaires et en évitant de cultiver les variétés trop sensibles. Ceci nécessite de connaître le degré de résistance des variétés sélectionnées.

Le charbon, maladie fongique causée par *U. scitaminea*, s'exprime naturellement au champ au fil des repousses et des replantations de matériel infecté. Les observations effectuées lors des premières étapes de sélection sont insuffisantes et nécessitent un complément d'information pour cette maladie. Une étude des variétés, en cours de sélection, effectuée dans des conditions de forte pression parasitaire et sur plusieurs cycles de récolte est nécessaire.

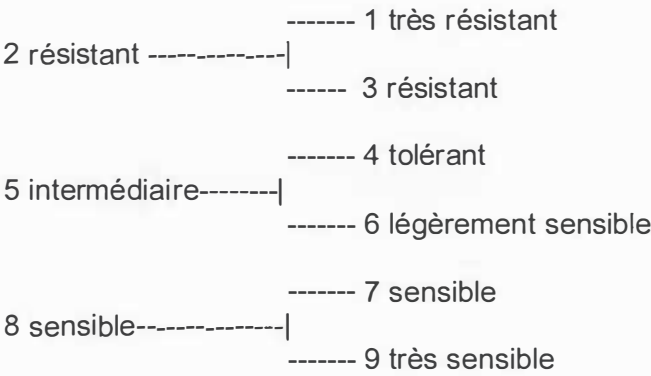
Tableau 1 : Rappel des tests effectués en 2002 sur les séries en essais.

Série	Nombre de clones *	rabougrissement des repousses	échaudure des feuilles	charbon	observation
FR 94	Xa, char : 65 RSD : 64	terminé en 2002	terminé en 1999	terminé en 2001	plantation novembre 1998
FR 95	64	année 2		terminé en 2002	plantation octobre 1999
FR 96	Xa, char : 45 RSD : 46	année 1 année 2 non effectuée	terminé en 2001	année 2	plantation juin 2000
FR 97	52	année 1	terminé en 2002	année 1	plantation mai 2001
FR 98	37		En cours		plantation mai 2002
FR 99	60		En cours		plantation mai 2002

\* Incluant les clones retestés qui sont en fin de sélection.

**Les résultats des tests terminés en 2002 sont donnés en annexes 1 à 3. Les résultats des variétés en fin de sélection et variétés prometteuses sont données en annexe 4.**

Les valeurs obtenues après 3 années d’observation pour le charbon et le rabougrissement des repousses, et après 1 année pour l’échaudure des feuilles, permettent d’évaluer les clones selon l’échelle de notation suivante :



**Descriptif des essais :**

**Nombre de variétés :**

- Série FR 94 : 60 clones.
- Série FR 95 : 61 clones.
- Série FR 96 : 45 clones.
- Série FR 97 : 46 clones
- Série FR 98 : 30 clones
- Série FR 99 : 58 clones
- variétés FR en fin de sélection : 18 clones.
- 15 variétés commerciales et étrangères.



**Parcelle élémentaire :** 12 m<sup>2</sup> (2 lignes de 4 m). Sauf pour test RSD (1 ligne de 4 m).

Pas de répétition sauf pour les témoins.

**Plantation :** 15 boutures de 2 bourgeons par ligne de 4 m.

**Charbon (*U. Scitaminea*) :**

Les plantes sont inoculées par trempage de boutures dans une suspension de spores dosée à 10<sup>6</sup> spores par ml. La résistance des plantes est évaluée par rapport au nombre de plantes malades qui présentent un fouet charbonneux. Les fouets sont dénombrés à plusieurs reprises pour chaque cycle de récolte : à 6, 8 et 10 mois en canne plantée et à 4 et 8 mois lors des 2 repousses suivantes.

**Echaudure des feuilles (*X. albilineans*) :**

Les plantes sont inoculées 5 mois après la plantation par la méthode de décapitation / aspersion. La suspension bactérienne utilisée est dosée à 10<sup>8</sup> ufc (unité formant des colonies) par ml. Les symptômes sont notés à 1 mois sur les feuilles inoculées pour contrôler l'efficacité de l'inoculation et 3 mois après l'inoculation (IDM). La résistance des plantes est évaluée en fonction de la symptomatologie et de la colonisation de la tige par la bactérie.

Cinq mois après inoculation, 6 à 8 tiges sont échantillonnées par parcelle. Un extrait de jus est prélevé dans la partie inférieure (troisième entrenœud sous la zone d'inoculation) de chaque tige par centrifugation d'un morceau de tige de 2 cm de long. Pour chaque prélèvement un aliquote est déposé sur milieu de culture pour le dénombrement des populations bactériennes.

**Rabougrissement des repousses (*C. xyli* subsp. *xyli*) :**

Les plantes sont inoculées à la plantation. La technique d'inoculation consiste à tremper le couteau de coupe avant chaque section de bouture dans un broyat de plants infectés par Cxx et cultivés *in vitro*. L'inoculum est dosé à environ 5 10<sup>6</sup> bactérie par ml.

En fin de chaque cycle, après 12 mois de culture, la contamination des plantes est contrôlée par test TBIA à raison d'un échantillon de 1 cm de diamètre prélevé dans le bas de 6 tiges par variété.

La résistance des plantes est estimée après 3 cycles de récoltes en fonction du nombre d'échantillons positifs et du nombre de faisceaux vasculaires colonisés (vvc) par *C. xyli* subsp. *xyli*.

## Annexe 1

### Test de résistance au Rabougrissement des Repousses

Série : FR 94

wc : vaisseaux vasculaires colonisés par Cxx, moyenne de 6 échantillons

tige + : nombre d'échantillons positifs sur 6.

Variété	Canne plantée		Première repousse		Deuxième repousse		Résistance
	wc	Tige +	wc	Tige +	wc	Tige +	Note
B 47 258	1.2	3	0.0	0	0.2	1	5
B 59 92	3.0	4	0.0	0	0.0	0	5
B 69 379	2.3	4	0.0	0	0.3	1	5
B 69 566	0.5	2	0.0	0	0.2	1	3
B 80 08	0.7	2	0.0	0	0.0	0	3
B 80 689	2.8	4	0.0	0	0.0	0	5
B 82 139	0.2	1	0.0	0	0.0	0	3
Co 64 15	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2
FR 87 0105	3.2	5	0.0	0	0.0	0	5
FR 87 0127	14.0	6	3.6	4	4.7	4	9
FR 87 0285	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2
FR 87 0288	4.7	5	1.0	2	0.0	0	5
FR 87 1011	6.5	6	0.2	1	2.3	4	7
FR 94 0022	0.3	1	0.0	0	0.7	2	3
FR 94 0026	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2
FR 94 0028	3.8	4	1.0	1	2.0	2	5
FR 94 0036	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2
FR 94 0054	1.0	4	0.2	1	0.0	0	3
FR 94 0056	1.5	2	0.0	0	0.0	0	3
FR 94 0064	1.8	6	0.3	1	0.0	0	5
FR 94 0065	0.8	2	0.0	0	2.2	1	3
FR 94 0067	4.3	5	0.3	1	1.8	4	7
FR 94 0087	0.0	0	1.3	2	0.0	0	3
FR 94 0094	9.5	6	1.5	3	4.0	6	5
FR 94 0096	4.5	4	0.0	0	0.0	0	5
FR 94 0119	1.8	3	0.7	2	0.0	0	5
FR 94 0127	3.2	3	0.0	0	0.8	2	5
FR 94 0128	13.5	6	1.2	3	8.2	6	9
FR 94 0129	2.8	6	0.5	1	3.0	5	7
FR 94 0132	9.3	6	0.3	1	3.3	4	7
FR 94 0150	0.8	3	0.2	1	1.3	2	5
FR 94 0162	0.2	1	0.0	0	0.0	0	3
FR 94 0169	0.3	1	0.0	0	0.5	1	3
FR 94 0170	5.7	6	0.0	0	3.3	3	7
FR 94 0178	7.5	5	0.0	0	0.8	2	7
FR 94 0183	2.8	5	0.2	1	1.7	1	5
FR 94 0218	7.3	6	0.0	0	0.7	2	7
FR 94 0222	0.8	1	0.0	0	0.7	1	3
FR 94 0231	0.5	1	0.0	0	2.3	2	5
FR 94 0235	0.8	4	0.0	0	0.0	0	3
FR 94 0236	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2
FR 94 0238	1.5	3	0.0	0	1.8	3	5
FR 94 0239	9.3	4	0.7	3	0.2	1	7
FR 94 0259	0.2	1	0.2	1	0.0	0	3
FR 94 0276	16.0	6	1.0	1	5.3	5	9
FR 94 0282	11.8	6	0.5	2	2.0	5	7
FR 94 0293	2.5	4	0.3	1	1.5	1	5
FR 94 0295	0.2	1	0.0	0	0.0	0	3
FR 94 0302	4.2	5	0.5	2	3.2	4	7
FR 94 0304	2.7	3	0.8	2	2.2	4	5
FR 94 0313	1.8	1	0.0	0	2.7	3	5
FR 94 0314	2.2	5	0.3	1	0.0	0	5
FR 94 0318	0.5	2	0.0	0	0.0	0	3
FR 94 0319	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2
FR 94 0334	6.8	5	1.3	4	5.0	6	9
FR 94 0345	11.3	6	4.2	5	7.7	6	9
FR 94 0357	6.8	6	0.8	2	7.2	5	9
FR 94 0370	0.0	0	0.0	0	0.0	0	3
FR 94 0382	12.8	6	2.2	3	2.5	3	7
FR 94 0389	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2
FR 94 0428	1.0	1	0.0	0	0.0	0	3
FR 94 0444	8.7	6	0.3	2	2.8	4	7
FR 94 0519	14.0	5	2.5	5	7.3	6	9
FR 94 0557	8.2	6	2.2	3	2.0	3	7
R 570	0.2	1	0.0	0	0.0	0	3
R 579	0.0	0	0.0	0	0.0	0	2
<b>Moyenne</b>	<b>3.7</b>	<b>3.27</b>	<b>0.5</b>	<b>0.94</b>	<b>1.49</b>	<b>1.76</b>	<b>4.91</b>



## Annexe 2

### Test de résistance au charbon série FR95

Les valeurs expriment le nombre de tiges charbonnées et de tiges totales observées pour chaque variété  
(essai planté les 05 et 06 10/1999)

VAR	canne plantée									premiere repousse						deuxieme repousse						Note
FR95	6 mois			8 mois			10 mois			4 mois			8mois			4 mois			8 mois			
	fouets	total	%	fouets	total	%	fouets	total	%	fouets	total	%	fouets	total	%	fouets	total	%	fouets	total	%	
B 69 379	0	72	0.0	0	71	0.0	0	70	0.0	0	93	0.0	0	85	0.0	0	74	0	0	84	0.0	2
B 69 566	0	72	0.0	0	70	0.0	0	60	0.0	1	84	1.19	0	70	0.0	0	95	0	0	108	0.0	2
B 72 191	9	57	15.8	18	70	25.7	23	71	32.4	35	191	18.3	47	85	55.3	32	75	43				9
B69379 (1)	0	16	0.0	0	15	0.0	0	15	0.0	0	39	0.0	0	26	0.0	0	61	0	0	41	0.0	2
FR 95 0244 (1)	0	22	0.0	0	16	0.0	0	13	0.0	0	28	0.0	0	22	0.0	0	41	0	0	27	0.0	2
FR 83 2034	2	92	2.2	1	77	1.3	2	59	3.4	6	119	5.04	3	61	4.9	4	44	9.1	20	77	26.0	8
FR 87 0166	0	88	0.0	0	97	0.0	0	84	0.0	0	131	0.0	0	98	0.0	3	86	3.5	7	131	5.3	4
FR 90 0840	0	54	0.0	0	51	0.0	0	48	0.0	0	61	0.0	0	59	0.0	0	40	0	0	57	0.0	2
FR 95 0025	0	84	0.0	0	81	0.0	0	75	0.0	0	123	0.0	0	83	0.0	0	51	0	0	71	0.0	2
FR 95 0189	0	74	0.0	0	88	0.0	0	70	0.0	0	94	0.0	0	68	0.0	0	93	0	0	85	0.0	2
FR 95 0195	11	79	13.9	42	92	45.7	55	87	63.2	1	103	0.97	41	90	45.6	0	78	0	0	90	0.0	8
FR 95 0223	0	27	0.0	1	17	5.9	0	19	0.0	0	28	0.0	0	19	0.0	0	5	0	0	15	0.0	4
FR 95 0224	0	61	0.0	0	69	0.0	0	68	0.0	0	124	0.0	0	101	0.0	0	81	0	0	76	0.0	2
FR 95 0240	1	78	1.3	3	69	4.3	4	59	8.8	0	110	0.0	0	70	0.0	0	48	0	0	62	0.0	4
FR 95 0245	0	71	0.0	0	67	0.0	0	59	0.0	0	91	0.0	0	62	0.0	0	40	0	0	97	0.0	2
FR 95 0259	0	55	0.0	0	54	0.0	0	51	0.0	0	88	0.0	0	78	0.0	0	70	0	0	102	0.0	2
FR 95 0263	1	80	1.3	2	76	2.6	3	71	4.2	3	122	2.46	0	73	0.0	0	55	0	0	28	0.0	4
FR 95 0285	5	66	7.6	8	74	10.8	6	56	10.7	0	111	0.0	0	66	0.0	2	67	3	0	95	0.0	5
FR 95 0328	0	67	0.0	0	86	0.0	1	82	1.2	0	131	0.0	0	114	0.0	0	75	0	0	83	0.0	3
FR 95 0355	3	65	4.6	4	72	5.6	7	66	10.6	1	118	0.85	0	90	0.0	0	75	0	0	109	0.0	5
FR 95 0364	0	54	0.0	0	50	0.0	0	54	0.0	0	109	0.0	0	82	0.0	0	106	0	0	62	0.0	2
FR 95 0382	0	43	0.0	0	50	0.0	0	49	0.0	0	101	0.0	0	89	0.0	0	64	0	0	95	0.0	2
FR 95 0392	0	29	0.0	2	31	6.5	0	29	0.0	3	56	5.36	2	51	3.9	0	47	0	0	55	0.0	2
FR 95 0406	0	52	0.0	0	54	0.0	1	52	1.9	4	104	3.85	0	76	0.0	0	86	0	0	101	0.0	4
FR 95 0412	0	56	0.0	0	56	0.0	0	54	0.0	5	85	5.88	4	76	5.3	2	30	6.7	0	34	0.0	5
FR 95 0417	0	78	0.0	0	87	0.0	0	81	0.0	0	130	0.0	0	95	0.0	2	60	3.3	0	70	0.0	2
FR 95 0418	0	62	0.0	0	82	0.0	0	77	0.0	3	47	6.38	0	83	0.0	0	57	0	1	112	0.9	3
FR 95 0433	0	112	0.0	0	96	0.0	0	128	0.0	0	186	0.0	1	139	0.7	0	116	0	0	94	0.0	2
FR 95 0437	0	52	0.0	0	55	0.0	0	55	0.0	1	94	1.06	0	86	0.0	3	58	5.2	2	63	3.2	3
FR 95 0475	0	36	0.0	0	38	0.0	0	33	0.0	0	52	0.0	0	39	0.0	0	22	0	0	34	0.0	2
FR 95 0506	6	76	7.9	12	91	13.2	68	144	47.2	0	114	0.0	3	72	4.2	2	89	2.2	?	?		6
FR 95 0556	5	71	7.0	5	68	7.4	6	64	9.4	2	144	1.39	4	91	4.4	0	52	0	0	75	0.0	5
FR 95 0559	0	76	0.0	0	81	0.0	0	78	0.0	0	129	0.0	0	73	0.0	0	87	0	2	97	2.1	3
FR 95 0563	1	70	1.4	4	91	4.4	0	86	0.0	4	146	2.74	4	129	3.1	0	131	0	0	99	0.0	5
FR 95 0575	0	44	0.0	0	46	0.0	0	46	0.0	0	94	0.0	0	56	0.0	0	35	0	0	86	0.0	2
FR 95 0579	3	58	5.2	2	64	3.1	1	558	0.2	0	102	0.0	0	72	0.0	0	72	0	0	88	0.0	3
FR 95 0618	0	75	0.0	0	66	0.0	0	61	0.0	2	106	1.89	3	69	4.3	9	56	16	0	68	0.0	6
FR 95 0638	0	44	0.0	0	54	0.0	0	49	0.0	2	50	4	4	55	7.3	0	75	0	0	104	0.0	5
FR 95 0643	2	21	9.5	9	28	32.1	0	13	0.0	0	11	0.0	M	M	-	0	0	0	0	0		8
FR 95 0653	22	55	40.0	21	61	34.4	9	29	31.0	M	M	-	M	M	-	0	0	0	0	0		8
FR 95 0683	2	83	2.4	3	92	3.3	3	82	3.7	13	126	10.3	3	79	3.8	0	79	0	0	42	0.0	6
FR 95 0706	5	63	7.9	12	61	19.7	17	65	26.2	8	58	13.8	16	64	25.0	0	28	0	0	31	0.0	8
FR 95 0725	1	68	1.5	9	76	11.8	6	56	10.7	0	82	0.0	0	54	0.0	0	53	0	0	45	0.0	5
FR 95 2064	0	76	0.0	0	91	0.0	0	84	0.0	0	126	0.0	0	126	0.0	0	80	0	2	186	1.1	3
FR 95 2112	0	35	0.0	0	47	0.0	0	46	0.0	0	31	0.0	0	27	0.0	0	37	0	0	63	0.0	2
FR 95 2117	0	75	0.0	2	82	2.4	0	86	0.0	0	92	0.0	0	67	0.0	0	67	0	0	93	0.0	2
FR 95 2118	0	95	0.0	0	96	0.0	0	92	0.0	0	110	0.0	0	86	0.0	0	59	0	0	93	0.0	2
FR 95 2155	3	79	3.8	3	92	3.3	3	87	3.4	0	109	0.0	3	95	3.2	0	46	0	0	97	0.0	5
FR 95 2159	0	89	0.0	0	93	0.0	0	85	0.0	0	144	0.0	0	82	0.0	0	93	0	0	56	0.0	2
FR 95 2166	2	65	3.1	0	68	0.0	0	62	0.0	4	69	5.8	1	68	1.5	6	47	13	2	108	1.9	6
FR 95 2179	0	110	0.0	0	103	0.0	0	98	0.0	9	159	5.66	2	100	2.0	1	97	1	2	126	1.6	5
FR 95 2189	0	60	0.0	0	64	0.0	0	59	0.0	0	98	0.0	0	70	0.0	0	81	0	4	126	3.2	3
FR 95 2194	0	78	0.0	0	76	0.0	0	69	0.0	0	120	0.0	1	99	1.0	1	67	1.5	0	69	0.0	3
FR 95 2199	0	126	0.0	0	135	0.0	0	131	0.0	0	148	0.0	6	119	5.0	3	84	3.6	0	115	0.0	3
FR 95 2200	0	54	0.0	0	56	0.0	0	53	0.0	0	102	0.0	0	81	0.0	0	78	0	0	38	0.0	2
FR 95 2240	0	55	0.0	0	54	0.0	0	55	0.0	2	90	2.22	1	69	1.4	5	50	10	2	95	2.1	6
FR 95 2209	3	60	5.0	3	59	5.1	0	57	0.0	9	109	8.26	3	75	4.0	12	66	18	0	27	0.0	8
FR 95 2222	0	109	0.0	0	119	0.0	0	112	0.0	0	141	0.0	0	104	0.0	0	83	0	0	92	0.0	2
FR 95 2230	0	101	0.0	0	105	0.0	0	90	0.0	0	159	0.0	0	110	0.0	0	74	0	0	46	0.0	2
FR 95 2233	0	69	0.0	0	72	0.0	0	74	0.0	0	68	0.0	0	83	0.0	0	60	0	0	69	0.0	2
FR 95 2247	1	84	1.2	0	92	0.0	0	87	0.0	0	176	0.0	0	115	0.0	0	102	0	0	110	0.0	3
FR 95 2248	0	58																				

## Annexe 3

### Série FR 97 : test de criblage pour la résistance à l'échaudure des feuilles.

Année 2002

Série FR 97	ISFI	IDM	Positifs/6	Log (ufc/ml)	Note
FR97 004	42.13	4.26	4	4.80	5
FR97 007	52.68	7.32	6	5.95	5-8
FR97 011	21.43	0.00	2	1.02	2
FR97 012	36.36	5.82	6	8.10	8
FR97 013	22.04	0.00	1	1.37	2
FR97 016	24.40	0.40	2	2.29	2
FR97 020	31.43	2.50	2	1.69	2
FR97 021	26.40	1.60	6	6.71	8
FR97 031	23.59	0.51	0	0.00	2
FR97 032	24.57	0.57	1	1.17	2
FR97 033	10.71	0.00	2	1.42	2
FR97 034	19.38	0.00	5	5.03	5
FR97 037	11.43	0.00	6	4.89	5
FR97 038	14.00	0.00	3	3.63	5
FR97 039	41.40	0.00	5	5.30	5
FR97 041	17.14	1.14	3	2.36	2
FR97 045	60.00	0.00	3	3.65	5
FR97 046	42.07	1.38	2	0.90	2
FR97 047	30.31	0.00	0	0.00	2
FR97 049	61.86	1.00	2	1.10	2
FR97 052	32.09	0.47	6	6.24	5-8
FR97 053	28.48	1.21	2	2.55	2
FR97 057	7.65	0.59	5	4.12	5
FR97 059	24.09	0.00	1	0.79	2
FR97 072	16.17	11.06	6	7.90	8
FR97 080	8.28	0.00	5	4.64	5
FR97 081	0.00	1.36	6	6.22	5-8
FR97 082	7.18	0.00	0	0.00	2
FR97 084	10.00	0.63	4	4.57	5
FR97 104	16.00	0.00	3	3.62	5
FR97 106	32.94	0.00	3	3.82	5
FR97 113	45.42	1.67	4	3.69	5
FR97 114	25.71	0.00	4	4.11	5
FR97 124	78.62	0.00	5	4.18	5
FR97 125	10.00	0.43	5	5.13	5
FR97 126	51.16	0.00	5	5.15	5
FR97 127	37.87	0.85	6	5.63	5
FR97 129	55.88	0.00	5	6.19	5-8
FR97 131	23.23	0.65	3	2.50	2
FR97 137	46.90	0.00	4	2.05	2
FR97 161	18.21	0.00	6	8.19	8
FR97 162	21.14	0.00	4	4.69	5-8
FR97 164	13.75	0.00	5	4.18	5
FR97 201	4.06	0.00	6	4.86	5
FR97 202	18.40	0.80	2	1.61	2
B47258	17.89	0.00	5	3.83	5
B69379	13.81	0.00	6	7.82	8
B69379	19.53	1.86	5	4.83	5
B69566	32.20	0.98	1	0.43	2
B69566	29.79	0.00	5	4.58	5
B86 690	29.41	2.94	3	2.17	2
BJ82119	4.44	0.00	5	6.40	5-8
FR89 0423	31.05	1.58	5	5.30	5
FR90 0714	16.82	0.00	6	7.53	8
Nco376	21.82	0.00	2	2.23	2
Nco376	30.00	0.00	3	2.20	2
Nco376	8.16	0.41	3	1.40	2
R575	37.07	0.49	5	6.91	8



## Annexe 4

Résultats des tests de résistances des variétés prometteuses et récemment libérées.  
R = résistant, I = intermédiaire, S = sensible

Variété	Charbon (% maximum observé)			Echaudure des feuilles		Rabougrissement des repousses	
	Test 1	Test 2	Test 3	Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
B80 689	R			S		En cours	
B86 690	En cours			R			
B86 81	En cours			En cours		En cours	
R575	R (1%)	En cours		S		En cours	
R579	R (0%)	En cours	En cours	I	I	En cours	En cours
FR83 2034	S (26%)			En cours		En cours	
FR83 2035	R (1%)			I			
FR87 105	R			I		I	
FR87 127	R			I		S	
FR87 166	I (5%)	En cours		En cours	En cours	En cours	En cours
FR87 285	R (2%)			R		R	
FR87 288	R			I		I	
FR87 1011	I (4%)			I		S	
FR88 196	R (0%)	En cours		En cours		En cours	
FR89 423	R(1%)	En cours		I		En cours	
FR89 746	R (1%)						
FR90 306	R (0%)	En cours		En cours		En cours	
FR90 714	R (0%)	En cours		S		En cours	
FR90 840	I (5%)	R (0%)	En cours	En cours		En cours	
FR91 384	I (4%)	En cours		En cours		En cours	
FR91 486	S (16%)	En cours		En cours		En cours	

## ➤ Action n°2 : Recherche de nouvelles méthodes de criblage pour la résistance aux maladies

**Objectifs :** Eliminer le plus rapidement possible dans le schéma de sélection les clones sensibles aux maladies.

⚙ **Méthode précoce de criblage pour la résistance à la maladie du charbon (essai d'inoculation des seedlings à la maladie du charbon).**

### Descriptif :

#### **Etape 1 : 1999-2001**

Nombre de familles : 4 + Nco376

Origine : seedlings sauf Nco376

Traitements : Inoculation au charbon la veille de la plantation par trempage des seedlings (boutures pour Nco376) pendant 20 min dans une suspension de spores dosée à  $10^6$  spores/ml (SI).

Inoculation des témoins avec de l'eau (SN).

Dispositif: L'essai est un split-plot de 4 blocs avec les variétés disposées en parcelles principales et les traitements (inoculation charbon et eau) en parcelles secondaires. Les parcelles élémentaires sont constituées de 20 touffes de canne.

Plantation : 9 septembre 1999.

Récoltes : Canne plantée (CP), Repousse 1 (R1).

Observations: dénombrement des individus charbonnés, 5 observations ont été effectuées au premier cycle de culture et 5 en repousse.

#### **Etape 2 : 2001-2002**

Soixante dix sept individus n'ayant pas montré de charbon ont été prélevés dans chacun des 2 traitements parmi les 4 familles étudiées (77 SI et 77 SN). Ces individus ont été testés quand à leur résistance au charbon par la méthode usuelle, en inoculant les plantes par trempage des boutures dans une suspension de spores lors de la plantation.

Nombre d'individus : 77 SI et 77 SN n'ayant pas montré de foudres charbonneux

Traitements : Charbon (ch) : inoculation des boutures par trempage dans une suspension de spores dosée à  $10^6$  spores/ml.  
Témoin (eau) : boutures traitées à l'eau.

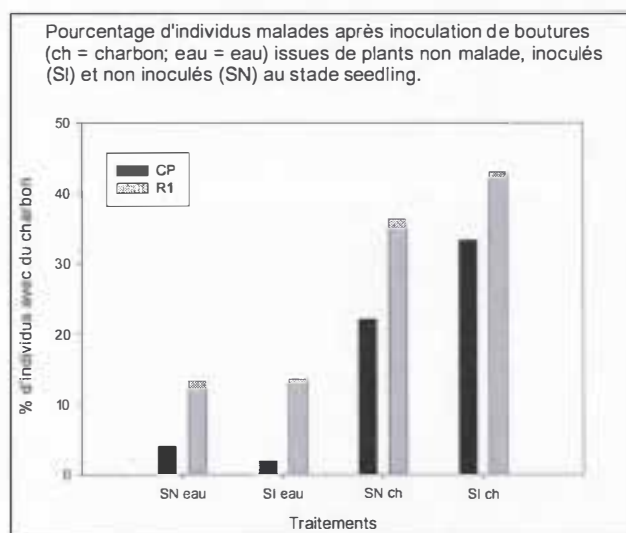
Dispositif : Bloc complet, randomisation totale (4 blocs). Nco376 est utilisé comme témoin sensible.

## Analyse des données :

L'analyse statistique des données est effectuée sur les proportions de touffes charbonnées par parcelle élémentaire (après transformation angulaire des données) grâce au logiciel SAS 8, au moyen de la procédure 'glm'.

## Résultats :

**Etape 1 :** L'inoculation des plantules issues de semis (seedling) selon le protocole décrit augmente la proportion d'individus ayant montré du charbon l'année de la plantation et en repousse. En revanche cette augmentation n'est significative statistiquement que la première année. Les pourcentages d'individus malades totaux observés en canne plantée pour les 4 familles étudiées sont respectivement de 14,8 et 10,1% pour les plants issus de semis inoculés et non inoculés. En première repousse ces valeurs étaient respectivement de 23,7 et 18,5%.



**Etape 2 :** Les individus non infectés issues de ces semis inoculés et non inoculés ont été soumis au test de résistance au charbon par inoculation des boutures. Pour les individus inoculés au stade bouture, aucune différence significative (seuil de probabilité de 5%) du nombre de plantes malades n'a été observée en fonction de l'origine des plantes (SI -semis inoculés- ou SN -semis non inoculé-) bien que, contrairement à nos attentes, la proportion d'individus malades semble supérieur pour les clones déjà inoculés au stade semis que pour les clones non inoculés au stade semis (Figure ci-contre). Pour les individus non inoculés

au stade bouture les nombres de plantes malades obtenus sont identiques. Dans nos condition d'expérimentation, l'inoculation des plantules après semis n'a pas permis de diminuer le nombre de clones sensibles observés au cycle de culture suivant. Il n'est pas impossible que la première inoculation ait favorisé la contamination des plantes lors de la deuxième inoculation.

## Perspectives 2003 :

Contrôle des risques de sensibilisation des plants de canne à sucre lors de l'inoculation des clones au stade plantule après semis.

## ✎ Mise au point d'un test de criblage pour la résistance au SCYLV.

Le SCYLV est un lutéovirus qui se multiplie dans les vaisseaux du phloème. Une population élevée du virus dans ces vaisseaux, au niveau de la tige, est susceptible de provoquer des pertes de rendement en canne, comme c'est le cas pour d'autres maladies vasculaires de la canne à sucre (le rabougrissement des repousses). Evaluer la résistance des variétés par l'analyse du nombre de vaisseaux vasculaires contaminés par le virus semble donc être une méthode appropriée.

Les premiers résultats sur le sujet ont déjà été décrits dans le rapport CPER année 1999. L'objectif ici est de consolider les résultats obtenus.

### Descriptif de l'essai :

Nombre de variété : 67 clones de la série FR94.

Origine : Parcelle de multiplication pour stade 4 de la sélection.

Traitements : Pas de traitement spécifique.

Dispositif : 1 lignes de 4 m par variété, sans répétition.

Symptômes YLS : Pas d'observation.

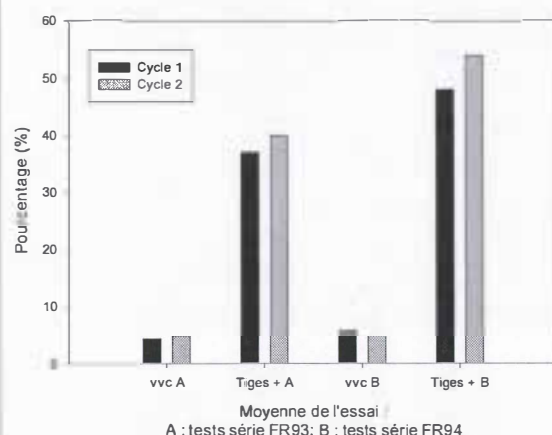
Diagnostic du SCYL : Le diagnostic du SCYLV a été réalisé sur 6 plantes par variété et sur 2 cycles de récolte, par TBIA.

### Méthodes :

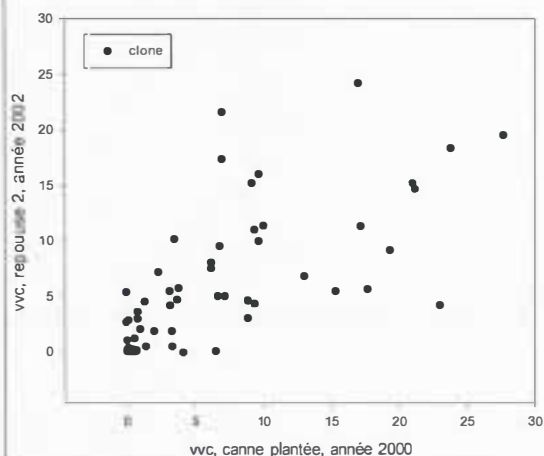
Le diagnostic du ScYLV est réalisé par immunoempreinte de tissus (TBIA = Tissue Blot Immuno Assay). L'échantillon imprimé sur une membrane de nitrocellulose correspond à une carotte de 1 cm de diamètre. Cette carotte est prélevée à la base de la tige, longitudinalement, près du noeud, à l'aide d'un perce bouchon de 1 cm de diamètre. La présence du virus est détectée par une coloration bleue des vaisseaux du phloème après révélation des membranes à l'aide des anticorps et réactifs nécessaires.

### Résultats :

Contamination des plantes par le SCYLV de 2 séries de clones en cours de sélection et sur 2 cycles de récolte (série FR93, résultats 1998 et 1999; série FR 94, résultats de 2000 et 2002). Vvc=vaisseaux vasculaires colonisés, tiges + = tiges positives au test de diagnostic du SCYLV)



Contamination des tiges par le SCYLV de 67 clones en cours de sélection. Dénombrement du nombre de vaisseaux vasculaires colonisés par le virus (vvc) sur un échantillon de tige de 1 cm de diamètre.



Comme observé précédemment (série FR93), après trois étapes de sélection, les taux de contamination des parcelles des clones en cours de sélection semblent constants d'un cycle de culture à l'autre, que l'on considère le



nombre de vaisseaux vasculaires colonisés (vvc) ou le nombre d'échantillons diagnostiqués positifs. Les données vvc et tiges positives pourraient être un bon indicateur de la résistance variétale au SCYLV et être utilisées pour le criblage des variétés en cours de sélection. Toutefois comme mentionné précédemment, certains clones voient le nombre de vvc augmenter entre les différents cycles de récolte testés alors que pour d'autres, l'infection semble diminuer. Afin de tenir compte de ces variations, les tests d'évaluation de la résistance des clones en cours de sélection au SCYLV devront être effectués au moins sur 2 cycles de culture.

### ➤ Opération n°3.      Epidémiologie de l'échaudure des feuilles.

**Chercheur :** Jean Heinrich DAUGROIS.  
**Techniciens :** Rosiane BOISNE-NOC, Steeve JOSEPH.  
**Stagiaire :** Patrice CHAMPOISEAU.

#### ➤ Action n°1 :      *Dissémination aérienne de Xanthomonas albilineans.*

**Objectif :** En 1993 puis en 1996, des symptômes atypiques d'échaudure des feuilles ont été observés dans des pépinières mères. De ces symptômes a été isolée *Xanthomonas albilineans*, bactérie responsable de l'échaudure des feuilles. Ces parcelles ont probablement étaient infectées après dissémination par voie aérienne de *X. albilineans*. L'objectif des travaux est d'évaluer et de comprendre ce mode de contamination qui est suspecté pour cette maladie depuis une dizaine d'années.

#### ↪ Descriptif de l'essai :

En mai 1999, 3 parcelles de canne à sucre ont été plantées dans différentes zones écologiques de Guadeloupe avec des 'vitro plants' sains.

<u>Basse Terre</u> :	♦ St Jean (Cirad-ca) :	Date de plantation : 11 mai 1999. Surface plantée : 2300 m <sup>2</sup> . Variétés : B69 566 et B80 08. Echantillonnage tiges : en CP, mars 2000; en R1, mars 2001; en R2, avril 2002.
	♦ Duclos (INRA) :	Date de plantation : 26 mai 1999. Surface plantée : 1600 m <sup>2</sup> . Variété : B69 566. Echantillonnage tiges : en CP, mars 2000; en R1, mars 2001; non effectué en 2002 pour cause de récolte étalée sur 3 mois en 2001.
<u>Grande Terre</u> :	♦ Godet (INRA) :	Date de plantation : 19 mai 1999. Surface plantée : 1400 m <sup>2</sup> . Variété : B69 566. Echantillonnage tiges : en CP, mars 2000; en R1, mars 2001; en R2, mars 2003.

#### Echantillonnages :

##### ① Gouttes de rosée :

Chaque parcelle étudiée a été divisée en petites parcelles élémentaires comptant 32 plants chacune (4 lignes de 8 plants). Les prélèvements de gouttes de rosée ont été effectués à l'aube au moyen d'une micro-pipette et de tubes Eppendorf préalablement stérilisés. Pour chaque parcelle

élémentaire, 1 goutte par plant a été prélevée sur les feuilles, soient 32 gouttes au total par échantillon.

Les échantillons sont ensuite ramenés au laboratoire et étalés à l'aide d'un ensemenceur spiral sur un milieu de culture sélectif (milieu WSD) afin de pouvoir effectuer un comptage des populations bactériennes. Les résultats sont exprimés en Log ufc/ml (unité formant colonie/ml)

② Echantillonnage de tiges :

Avant la récolte, des tiges sont échantillonnées sur chaque parcelle pour évaluer le pourcentage de tiges colonisées par *X. albilineans*. Une section nette, effectuée à l'aide d'un sécateur désinfecté à l'alcool et flambé, est réalisée dans le tiers haut (H) et le tiers bas (B) de chaque tige échantillonnée. Les sections de tige sont ensuite appliquées quelques secondes sur milieu de culture sélectif et les boîtes sont placées 5 jours à l'étuve à 28 degrés pour détecter l'apparition des colonies de *X. albilineans*.

🔗 Résultats :

Canne plantée :

Les premières bactéries de l'espèce *X. albilineans* ont été isolées de gouttes de rosée 4 à 5 semaines avant l'apparition de symptômes. La contamination des 3 parcelles étudiées ne s'est pas effectuée de façon synchrone. Les premières bactéries ont été isolées le 19 juillet, le 3 novembre et le 15 septembre, respectivement, pour les essais de St Jean, Duclos et Godet. La rapidité de la contamination semble dépendre de la proximité de plants de canne à sucre contaminés et du climat. Les populations bactériennes relevées dans les gouttes de rosée peuvent atteindre  $10^7$  ufc/ml (unité formant colonie). Les populations moyennes de *X. albilineans* relevées en fin de saison des pluies étaient plus élevées en zone humide, à St Jean et Duclos (Basse-Terre) qu'à Godet, en zone climatique sèche (Nord Grande Terre) tout comme le nombre de plantes contaminées par *X. albilineans* avant la récolte (tableau 1).

Tableau 1 : Densités de populations de *X. albilineans* dénombrées dans les gouttes de rosée en fin de saison des pluies sur 3 cycles de récolte pour 3 parcelles de canne à sucre de B69 566 et contamination des tiges associées à ces populations.

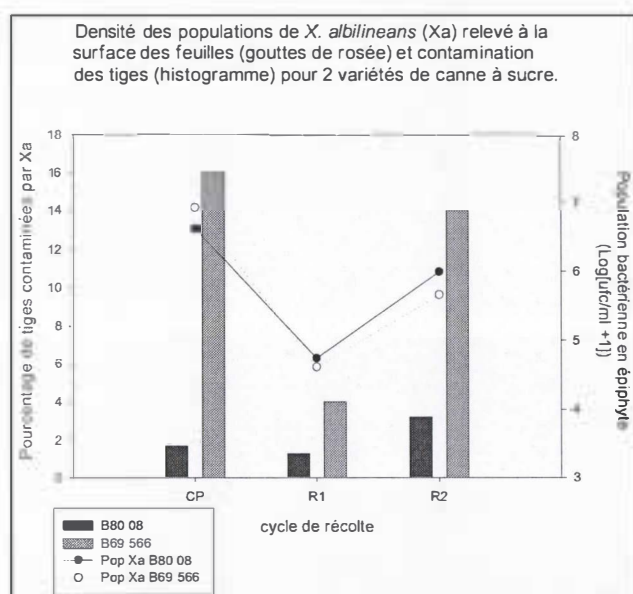
	Canne plantée		Première repousse		Deuxième repousse	
	Xa (ufc/ml)	Tiges contaminées	Xa (ufc/ml)	Tiges contaminées	Xa (ufc/ml)	Tiges contaminées
St Jean	$5,5.10^6$	16 %	$5,1.10^4$	4%	$4,6.10^5$	14%
Duclos	$1,6.10^6$	6%	$6,3.10^5$	7%	$1,05.10^7$	—
Godet	$3,2.10^4$	3%	2,2	2,5%	64	0,5%

Repousses :

Les trois parcelles ayant été contaminées lors de la canne plantée, *X. albilineans* a pu être dénombré à la surface des feuilles en R1 et R2 dès que

l'échantillonnage de gouttes de rosées étaient possibles, (c. a. d. dès que l'eau était disponible à la surface des feuilles) à l'exception de l'essai implanté à Godet, en zone sèche, pour lequel certains prélèvements en deuxième repousse étaient indemnes de *X. albilineans*. Le nombre de tiges contaminées n'a pas augmenté lors des repousses, celui-ci semble être lié aux populations de *X. albilineans* présentes en épiphyte au cours du cycle de récolte. Comme en canne plantée, les populations de *X. albilineans* observées à la surface des feuilles sont beaucoup plus faibles en zone sèche (Godet) qu'en zone humide. Il en est de même quant au nombre de tiges infectées par la bactérie (tableau 1).

### Effet de la résistance variétale sur la dynamique *X. albilineans* :



Les populations de *X. albilineans* en épiphyte et le nombre de tiges infectées par cette bactérie ont été suivi sur deux variétés de canne à sucre : B69 566 (sensible) et B80 08 (résistante). Les populations bactériennes observées en épiphyte sur B80 08 et B69 566 en fin de saison des pluies (novembre), sont identiques pour les 2 variétés mais varient d'une année à l'autre en fonction des conditions climatiques rencontrées. Les précipitations mensuelles moyennes relevées entre juillet et décembre étaient de 218, 148 et 211 mm, respectivement, pour les cycles de canne plantée (CP), première repousse (R1) et deuxième repousse (R2). En revanche, pour ces 2 variétés, le nombre de tiges contaminées dépend de la

sensibilité variétale et des densités de population bactérienne en épiphyte. En effet, le nombre de tige contaminée est beaucoup plus élevé pour la variété sensible B69 566 que pour B80 08, résistante à la maladie de l'échaudure des feuilles.

### Utilisation des parcelles contaminées comme source de boutures :

Des boutures de canne à sucre, des variétés B80 08 et B69 566, ont été prélevées en première repousse dans la parcelle de St Jean, en Basse Terre et plantées à proximité. Le nombre de tiges contaminées a été contrôlé sur un échantillon de 300 tiges, pour chaque variété, en fin de cycle et comparé à la contamination de la parcelle d'origine à la même période. Si les pourcentages de tiges contaminées sont plus élevés dans la nouvelle parcelle (7 et 19 %, respectivement, pour B80 08 et B69 566) que dans la parcelle d'origine (3 et 14%) cette augmentation n'est pas significative au seuil de 5% (test de  $\chi^2$ ).

### Conclusion :

En Guadeloupe, la phase épiphyte de *X. albilineans* joue un rôle important dans la contamination des plants de canne à sucre par cette



bactérie. Cette phase épiphyte est fortement liée au climat. Des précipitations régulières et une humidité élevée favorisent la contamination de la phyllosphère par *X. albilineans*, surtout lorsque des plants contaminés sont présents à proximité et/ou dans le champ de canne à sucre. En revanche, pendant le carême, lors de la maturation des cannes, ou en zone sèche (Grande Terre), la disponibilité en eau à la surface des feuilles est limitée et diminue ainsi le nombre de bactéries en épiphyte sur ces plantes.

**La contamination systémique des plantes est fortement liée aux densités de populations bactériennes observées à la surface des feuilles et à la sensibilité des variétés à l'échaudure des feuilles.**

Afin de limiter la contamination des plantes, après transmission par voie aérienne de la maladie, pour leur utilisation comme source de boutures, les pépinières de variétés sensibles devraient être installées en zone sèche (sous irrigation) ou cultivées lorsque la pression parasitaire est plus faible. En revanche, **le transfert de plants de variétés sensibles de la zone humide vers des zones plus sèches est à éviter**. En effet, ceci pourrait augmenter le nombre de plants contaminés du fait de l'introduction dans la zone de boutures contaminées par *X. albilineans* et, le stress hydrique aidant, voir apparaître des symptômes beaucoup plus sévères qu'en zone humide.

## ➤ **Action n°2 : Capacité colonisatrice et diversité génétique de Xanthomonas albilineans.**

**Objectif :** La détection de souches "aériennes" de *X. albilineans* au cours des années 1990 a coïncidé avec la recrudescence de l'échaudure des feuilles de la canne à sucre dans plusieurs zones géographiques, et notamment en Guadeloupe. Il a été mis en évidence qu'une nouvelle souche de la bactérie, possédant un génotype particulier (révélé par RFLP), était associée à cette recrudescence, suggérant ainsi l'hypothèse que la diversité génétique de *X. albilineans* est liée à la variabilité de la capacité de la bactérie à coloniser le feuillage de la canne à sucre. Par ailleurs, l'idée a été émise que l'albicidine, une toxine produite par la bactérie, pouvait jouer un rôle dans cette capacité de colonisation épiphyte. Ainsi, une étude de la diversité génétique de *X. albilineans* a été réalisée à partir d'une collection de 95 souches originaires de Guadeloupe, conjointement à une étude de la variabilité de deux composantes du pouvoir pathogène de la bactérie : i) la production de l'albicidine, impliquée dans l'induction de symptômes foliaires et ii) la capacité de colonisation épiphyte.

### **Variabilité de la quantité d'albicidine produite in vivo par X. albilineans.**

#### ↪ **Descriptif de l'essai :**

Cette méthode est basée sur la capacité de l'albicidine à inhiber la croissance d'*Escherichia coli*. Pour chacune des souches de *X. albilineans* étudiées, des suspensions bactériennes ont été préparées dans de l'eau

distillée stérile et dosées à  $10^9$  ufc/ml (unité formant colonie/ml). Dix microlitres de ces suspensions ont été déposés à l'aide d'une micro pipette au centre de boîtes de Pétri contenant un milieu de culture solide, et placées à l'étuve à 28°C. Après cinq jours de croissance, 3 ml d'une suspension d'*E. coli* DH5 $\alpha$  (sensible à l'albicidine) ont été coulés à la surface des milieux de culture de *X. albilineans*. Les cultures ainsi obtenues ont été placées à l'étuve à 37°C et après 24 h, les diamètres des colonies de *X. albilineans* et ceux des zones d'inhibition de la croissance d'*E. coli* ont été mesurés pour chaque souche. Les valeurs ainsi obtenues ont permis d'élaborer une variable, appelée LACI (ou largeur de la couronne d'inhibition) utilisée pour comparer les quantités d'albicidine produites par les différentes souches de *X. albilineans*.

## ➤ Résultats :

Grâce à la mesure de la LACI effectuée dans deux répétitions du test d'inhibition de la croissance d'*E. coli*, il a été montré une variabilité de la quantité d'albicidine produite *in vitro* parmi les 95 souches épiphytes originaires de Guadeloupe. En revanche, cette variabilité n'a pas pu être confirmée par l'analyse statistique des résultats qui n'a pas permis de révéler de différence significative ( $P = 0,05$ ) entre les souches. Par ailleurs, une interaction souche x répétition de l'essai hautement significative ( $P < 0,0001$ ) a été montrée, traduisant une grande variabilité des résultats d'une répétition de l'essai à l'autre (Tableau 2).

Tableau 2. Analyse statistique des essais de mesure de la quantité d'albicidine produite *in vitro* (variable étudiée = LACI ou Largeur de la couronne d'inhibition) par un groupe de 93 souches de *Xanthomonas albilineans* originaires de Guadeloupe (trois mesures soient trois boîtes de Petri par souche et par essai). L'essai a été répété indépendamment une fois. L'analyse de variance a été effectuée à partir des valeurs de LACI non transformées.

Source de variation	ddl	Carré moyen	Valeur de F	$P > F$
Souche	92	57,47	1,26	0,131
Répétition de l'essai	1	61,55	1,36	0,246
Souche x répétition de l'essai	92	45,44	119,65	0,0001
Erreur	353	0,38		

Parmi les 95 souches testées, 10 souches ayant produit des quantités d'albicidine différentes ont été choisies pour la réalisation d'un essai de suivi de populations épiphytes de *X. albilineans*, et testées indépendamment quand à leur production d'albicidine (essai répété 3 fois) (Tableau 3). La comparaison de ces 10 souches épiphytes a permis de mettre en évidence un effet souche significatif lorsque les trois répétitions de l'essai ont été prises en compte dans l'analyse. Un test T de comparaison des moyennes a été employé pour comparer les souches deux à deux. Celui-ci a permis de différencier (au seuil de 5 %) la souche GPEF4 (la plus productrice d'albicidine) des souches GPESJ2 et GPEP14B (les moins productrices d'albicidine).

Tableau 3. Quantité d'albicidine produite *in vitro* par 10 souches épiphytes de *Xanthomonas albilineans* originaires de Guadeloupe (variable étudiée = LACI ou Largeur de la couronne d'inhibition). Chaque valeur représente la moyenne de neuf mesures obtenues au cours de trois bio-essais indépendants (trois boîtes de Petri par souche et par essai).

Souche	LACI (mm) ± écart-type
GPET16	15,9 ± 7,5
GPE48	14,0 ± 8,0
GPESJ2	8,7 ± 5,8
GPEDC23	13,4 ± 4,2
GPEDC38	20,7 ± 6,7
GPEG5	17,3 ± 6,3
GPEF4	22,5 ± 5,5
GPEDC61	14,1 ± 2,4
GPEP14B	8,8 ± 3,1
GPESJ47	17,1 ± 7,2

## Contamination aérienne de la canne à sucre et suivi des populations épiphytes

### 🔍 Descriptif de l'essai :

Cette étude a été réalisée en conditions semi-contrôlées sous serre tunnel. La surface des feuilles de canne à sucre a été pulvérisée avec dix souches de *X. albilineans* prélevées en Guadeloupe. Après inoculation, le suivi des populations bactériennes ainsi que l'apparition de symptômes ont été suivies à la surface du feuillage. Trois mois après inoculation, des feuilles de canne à sucre ont été échantillonnées afin de déterminer les densités de populations bactériennes présentes en surface et dans les feuilles des plantes inoculées.

**Cultivars de canne à sucre :** des jeunes vitroplants des cultivars de canne à sucre B69 566 et CP68-1026, connus pour être sensible et très sensible, respectivement, à l'échaudure des feuilles, ont été installés sous serre dans des pots de quatre litres contenant un mélange de terre/pouzzolane (V/V).

**Souches bactériennes :** les dix souches de *X. albilineans*, prélevées sur des cannes contaminées naturellement par voie aérienne au champ et testées ont été choisies par rapport à leur production d'albicidine pour l'essai (Tableau 3). Afin de s'assurer de la pathogénie de ces souches, et notamment de leur capacité à produire des symptômes foliaires d'échaudure des feuilles, celles-ci ont préalablement été transmises au cultivar B69 566 par la méthode de décapitation/dépôt. Les souches ont ensuite été isolées, des plantes inoculées, sur milieu WSD par dilacération de feuilles présentant des symptômes, deux semaines environ après inoculation.

**Dispositif expérimental :** le dispositif expérimental adopté pour cette étude était un dispositif en blocs aléatoires complets à deux répétitions. L'unité expérimentale était constituée de quatre plants de canne à sucre. Les conditions environnementales sous la serre étant considérées homogènes, les blocs ont été disposés de manière à contrôler le facteur lié à l'inoculation (celle-ci ayant été réalisée par des inoculateurs différents pour chacun des blocs). Neuf plantes témoins non inoculées du cultivar B69 566 ont été disposées sur une ligne centrale entre les blocs afin de contrôler la dispersion



des souches de *X. albilineans*. L'essai a été répété une fois dans les mêmes conditions à sept jours d'intervalle (essais InXa 1 et InXa 2).

**Conditions expérimentales et méthode d'inoculation :** la serre a été équipée d'un système d'aspersion par brumisation afin de garantir des conditions optimales pour la survie des bactéries épiphytes. Une minute d'aspersion a été programmée toutes les trois heures sur 24 heures et tout au long de l'essai (13 semaines). L'inoculation a été réalisée sur des plants âgés de deux mois (six à sept feuilles par plant en moyenne) et à l'aide de vaporisateurs manuels. Les inoculums ont été préparés à partir de cultures denses de *X. albilineans* préparées en solutions et dosées à  $10^8$  ufc/ml en volumes suffisants pour l'inoculation (250 ml par souche et par bloc). Au moment de l'inoculation, les plants inoculés avec des souches différentes ont été séparés dans la serre avec des cloisons mobiles en papier kraft afin d'éviter les inoculations croisées. L'inoculation a été réalisée en fin de journée pour bénéficier de l'humidité nocturne. Enfin, des boîtes de Petri ouvertes contenant du milieu WSD ont été placées au sol au moment de la pulvérisation de chaque souche pour contrôler l'efficacité de l'inoculation. Après l'inoculation, les feuilles correspondant au premier ochréa visible (zone de jonction du limbe et de la gaine foliaire) à partir du sommet de la tige ont été marquées au feutre indélébile afin de pouvoir les identifier tout au long de l'expérimentation.

**Suivi des populations épiphytes de *X. albilineans* :** pour chacune des deux répétitions de l'essai, le premier échantillonnage a été réalisé le lendemain de l'inoculation, puis tous les deux à trois jours pendant les deux premières semaines, et enfin toutes les semaines jusqu'à trois mois après inoculation. Chaque échantillon était constitué des gouttes d'eau prélevées par unité expérimentale (quatre plantes) au niveau des cinq à six feuilles vertes les plus basses des plants inoculés ; 0,5 à 1,0 ml d'eau ont ainsi été rassemblés par échantillon dans des tubes Eppendorf stériles de 2 ml au moyen de micropipettes. Les densités de populations bactériennes ont été déterminées pour chaque unité expérimentale après cinq jours de croissance à 28°C. Elles ont été exprimées en Log (ufc/ml + 1).

**Populations bactériennes de la phyllosphère :** trois mois après inoculation, les densités de populations de *X. albilineans* ont été déterminées par broyage des feuilles. Pour chaque tige, toutes les feuilles ont été numérotées à partir du premier ochréa visible. Quatre tiges ont été échantillonnées par parcelle expérimentale. Les deux feuilles vertes les plus âgées ont été prélevées et le limbe de chaque feuille a ensuite été découpé en morceaux d'environ 3 cm qui ont été pesés et broyés pendant 30 secondes dans 75 ml de tampon TBS en conditions stériles. Après 20 minutes, le jus de broyage a été récupéré par filtration à travers une gaze stérile et étalé sur milieu WSD à l'aide d'un ensemenceur spiral. Au moment de la lecture des boîtes d'isolement, des colonies ont été prélevées aléatoirement et leur appartenance à l'espèce *albilineans* a été testée par affinité spécifique avec des anticorps polyclonaux en utilisant la méthode de séroagglutination. Les moyennes des populations épiphytes de *X. albilineans*, calculées par bloc et par essai, ont été comparées par une analyse statistique.

**Capacité de colonisation des tiges par les bactéries épiphytes de *X. albilineans* :** afin d'évaluer la capacité des souches de *X. albilineans* à coloniser les tiges de canne à sucre inoculées par aspersion, des empreintes de tiges sur milieu de culture WSD ont été réalisées une semaine après le prélèvement des feuilles pour la détermination des populations bactériennes de la phyllosphère. Les

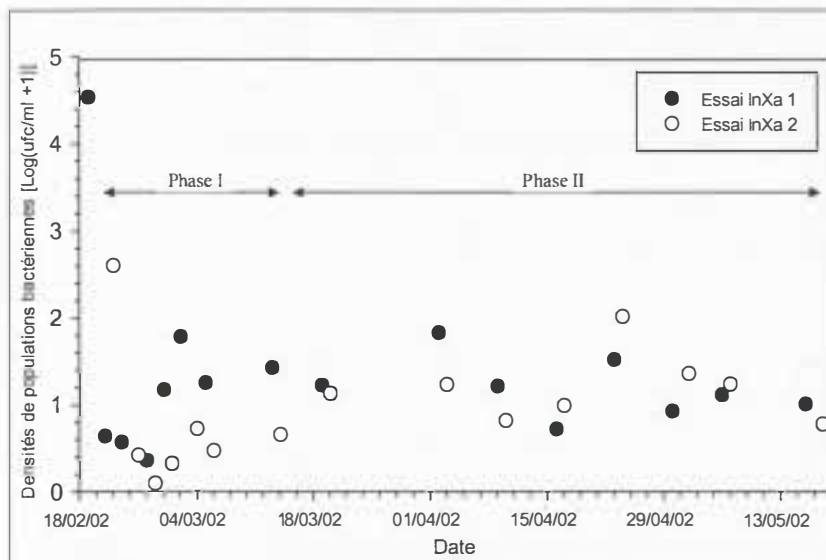


tiges utilisées pour cette étude étaient celles qui avaient été préalablement choisies pour le broyage des feuilles. Quatre sections transversales ont été réalisées par tige au moyen de sécateurs préalablement flambés avec de l'alcool. Trois sections notées S1 à S3 (du bas vers le haut de la tige) ont été effectuées au niveau des entre-nœuds jouxtant les zones d'insertions des gaines des feuilles prélevées pour le broyage. La section S4 a été réalisée dans le haut de tige, trois entre-nœuds au dessus de la section S3. Chaque section a été effectuée 1 cm en dessous du nœud supérieur de l'entre-nœud considéré. Les sections de tiges ont été appliquées pendant deux à trois secondes à la surface du milieu de culture WSD, puis les boîtes ont été placées pendant cinq jours à l'étuve à 28°C. L'identité des colonies de *X. albilineans* a été vérifiée par séroagglutination.

## ❧ Résultats :

*Xanthomonas albilineans* a été détecté à la surface des feuilles pendant trois mois après l'inoculation des plantes, et dans les deux répétitions de l'expérimentation (essais InXa 1 et InXa 2). Pendant cette période, 16 prélèvements ont été effectués pour l'essai InXa 1 et 15 pour InXa 2. La progression des densités de populations bactériennes, toutes souches de *X. albilineans* confondues, étaient similaires dans les deux essais (Figure 1).

Les prélèvements suivants ont permis d'identifier deux phases : une première phase, appelée phase I, au cours de laquelle les populations bactériennes ont très rapidement et fortement baissé (en termes de densités bactériennes et de pourcentage de parcelles élémentaires contaminées) avant d'augmenter progressivement (Figure 1). Au cours de la deuxième phase, ou phase II, les populations bactériennes sont restées relativement stables à la surface des feuilles, avec des densités maximales de 70 ufc/ml d'eau en surface de feuille pour l'essai 1 et 10<sup>2</sup> ufc/ml pour l'essai InXa 2.



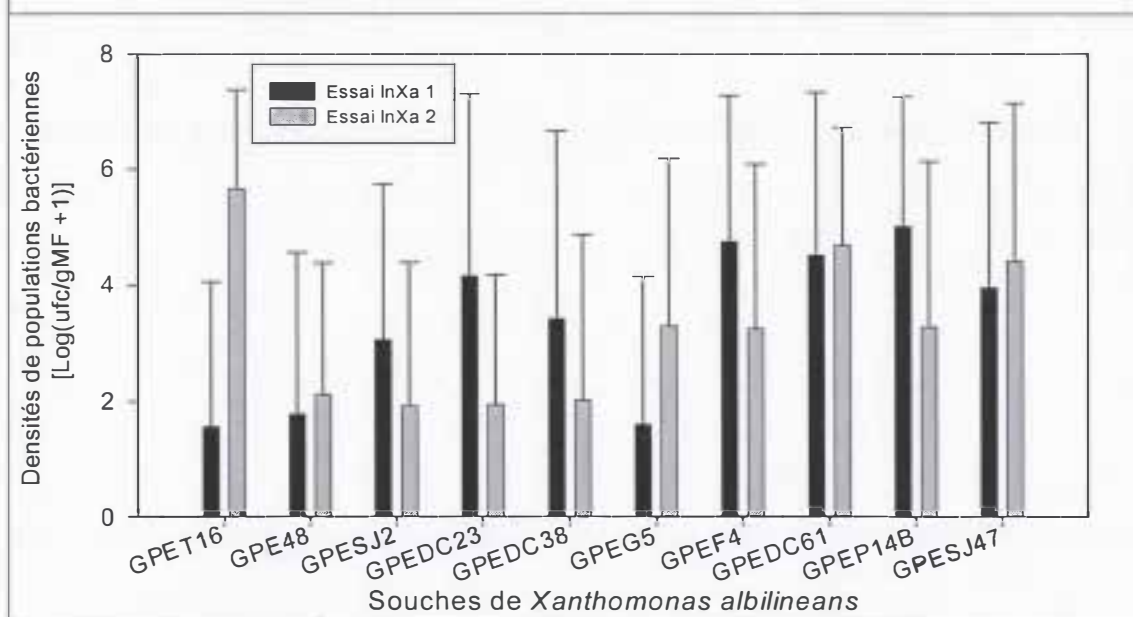
**Figure 1.** Progression des densités de populations bactériennes épiphytes après inoculation par aspersion de deux cultivars de canne à sucre (B69566 et CP68-1026) avec 10 souches "épiphytes" de *Xanthomonas albilineans* originaires de Guadeloupe. Chaque point correspond à la moyenne de 40 prélèvements (deux prélèvements ont été réalisés par souche de *Xanthomonas albilineans* et par cultivar de canne à sucre à chaque date de prélèvement).

La progression des populations en fonction des souches et des essais est, quant à elle, apparue beaucoup plus aléatoire. En effet, les populations bactériennes des 10 souches ont progressé de façon très différente entre elles, d'une part, et d'un essai à l'autre pour la même souche, d'autre part. Un effet souche significatif ( $P = 0,003$ ) a été mis en évidence lors de la phase I de

l'essai InXa 1. Au cours de cet essai, les densités de populations des souches GPEDC23 (60 ufc/ml) et GPEDC61 (56 ufc/ml) étaient supérieures à celles des souches GPEDC38 (3 ufc/ml) et GPE48 (2 ufc/ml) (test SNK au seuil de 5 % sur la moyenne des sept prélèvements de la phase I). Aucune différence significative n'a été détectée entre les 10 souches lors de la phase I de l'essai InXa 2. Un effet souche significatif a été mis en évidence lors de la phase II pour les deux essais ( $P = 0,027$  et  $P = 0,002$  pour les essais InXa 1 et InXa 2, respectivement). Les densités bactériennes étaient les plus élevées au cours de cette phase pour les souches GPESJ47 (339 ufc/ml) et GPEDC61 (190 ufc/ml). Les valeurs les plus faibles ont été observées pour les souches GPEF4 (4 ufc/ml), GPEDC38 (3 ufc/ml) et GPESJ2 (2 ufc/ml). Toutefois, une interaction essai x souche hautement significative a été mise en évidence lors de l'analyse en mesures répétées effectuées sur les données de la phase II (essais InXa 1 et InXa 2). Cette interaction traduit un comportement aléatoire d'une ou plusieurs souches d'un essai à l'autre.

En raison du dessèchement plus précoce (caractéristique variétale) de la majorité des feuilles les plus basses du cultivar B69 566, les populations épiphytes de *X. albilineans* ont été déterminées uniquement par broyage des feuilles du cultivar CP68-1026. La comparaison des 10 souches épiphytes pour les deux essais a été réalisée avec les feuilles vertes les plus basses de chaque tige, à raison de quatre prélèvements de deux feuilles par unité expérimentale.

**Figure 2.** Densités de populations de 10 souches "épiphytes" de *Xanthomonas albilineans* originaires de Guadeloupe. Les données ont été déterminées par broyage de feuilles du cultivar CP68-1026 trois mois après inoculation des plantes par pulvérisation du feuillage. L'expérimentation réalisée sous serre a été répétée une fois dans le temps (essais InXa 1 et InXa 2). Chaque colonne correspond à la moyenne des valeurs de 16 feuilles.



Les densités de populations bactériennes (toutes souches confondues) étaient similaires dans les deux essais :  $2,4 \times 10^3$  ufc/gMF et  $1,8 \times 10^3$  ufc/gMF pour l'essai InXa 1 et l'essai InXa 2, respectivement. Les populations

bactériennes de la souche GPEP14B ( $5,6 \times 10^4$  ufc/gMF) étaient plus élevées dans l'essai InXa 1 et celles de la souche GPET16 ( $4,6 \times 10^5$  ufc/gMF) dans l'essai InXa 2 (Figure 2). Lorsque les deux essais ont été analysés séparément, puis en mesures répétées, aucun effet souche significatif (au seuil de 5 %) n'a été mis en évidence. Des différences importantes (test de comparaison des moyennes deux à deux) ont cependant été notées entre certaines souches dans chaque essai :  $1,1 \times 10^5$  ufc/gMF pour la souche GPEF4 et 76 ufc/gMF pour la souche GPEG5 ( $P = 0,0745$ ) dans l'essai InXa 1 ;  $2,1 \times 10^4$  ufc/gMF pour la souche GPESJ47 et  $1,0 \times 10^2$  ufc/gMF pour la souche GPEDC38 ( $P = 0,038$ ) dans l'essai InXa 2. La présence de *X. albilineans* a aussi été recherchée à l'intérieur des tiges trois mois après inoculation. Pour chaque cultivar, 640 empreintes de sections de tiges ont été réalisées sur milieu WSD et pour l'ensemble des 10 souches. Des colonies comparables à celles de *X. albilineans* ont été isolées à partir des sections S2 de deux tiges du cultivar CP68-1026. Ces tiges avaient été prélevées dans deux blocs différents et avaient été inoculées avec les souches GPESJ2 et GPET16. La réaction de séroagglutination entre les colonies bactériennes isolées des deux tiges et le sérum anti-*X. albilineans* a été positive.

## **Diversité des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine**

### **🔗 Descriptif de l'essai :**

La variabilité génétique d'une région du génome impliquée dans la biosynthèse de l'albicidine a été étudiée grâce à la technique RFLP parmi les 95 souches épiphytes de *X. albilineans* originaires de Guadeloupe.

### **🔗 Résultats :**

Des profils de restriction distincts nommés HB1 et PB1, pour les enzymes *HincII* et *PstI*, respectivement, ont été obtenus. Avec chacun des deux enzymes, aucune variabilité génétique de la région étudiée n'a été mise en évidence dans la collection de souches épiphytes de *X. albilineans* originaires de Guadeloupe.

Une étude menée conjointement sur une collection de souches de *X. albilineans* d'origines géographiques diverses a montré qu'il existait une variabilité de cette région du génome, impliqué dans la biosynthèse de l'albicidine : deux groupes génétiques majeurs, regroupant 6 et 5 haplotypes distincts, obtenus avec les enzymes *HincII* et *PstI*, respectivement, ont été identifiés.

### **Conclusion :**

Toutes les souches "épiphytes" originaires de Guadeloupe ont montré le même profil génétique alors que des variations de production d'albicidine plus ou moins importantes ont été notées pour certaines de ces souches. Ces résultats laissent penser que ces variations ont probablement une origine génétique qu'il reste à préciser. Les essais mis en place avec les 10 souches épiphytes de *X. albilineans* choisies en Guadeloupe n'ont pas permis d'établir

de relation entre la quantité d'albicidine produite *in vitro* et l'aptitude à coloniser et/ou se multiplier à la surface des feuilles de canne à sucre. Néanmoins, les résultats obtenus nous permettront de proposer des solutions pour l'amélioration des méthodes expérimentales. Ils ont aussi permis d'élargir les perspectives d'étude des relations entre la variabilité des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'albicidine d'une part, et la variabilité des composantes du pouvoir pathogène de *X. albilineans* d'autre part.